

QP  
501  
J67

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KAZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XII

TOKYO

1931

COPYRIGHT 1930

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

## CONTENTS OF VOLUME XII.

No. 1, April, 1930

	Page
IMAZU, Tsunamoto. Experimentelle Untersuchungen über die Glykogenbildung in der Leber mit Hilfe von Durchblutungsversuchen bei künstlich hervorgerufenem Fieber .....	1
INOUE, Kikuziro. A method of estimating the net volume of precipitated proteins in the albuminuria .....	7
YOSHIMURA, Shigeo. Beiträge zur Chemie der Askaris .....	27
INABA, Michiaki. Studien über das Epithelkörperchen-Hormon und den Kalkstoffwechsel .....	35
SEKITOO, Tadao. Über den Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel (III) .....	59
WATANABE, Kazuo. Über die antipyretische Wirkung von 3-Aminohydrocarbostyryl, seinen Isomeren und Derivaten .....	71
ITOI, Motoo. The effect of the presence of various salts on the surface tension of sodium taurocholate solution .....	83
SO, Takehiko. Über die Hydrolyse der Benzoylderivate der Aminosäuren durch das Histozytm .....	107

No. 2, July, 1930

TSUNOO, Susumu und NAKAMURA, Hideo. Über die Bilirubinbildungsfähigkeit der überlebenden Milz von mit Thoriumdioxysol behandelten Hunden .....	133
TSUJI, Kaneji. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. (VIII). Über den Mechanismus der hypoglykämischen Wirkung der Gallensäure .....	139
SASO, Takeshi. The change in the amount of blood chlorine during asphyxiation from the view-point of acidosis. Report I. ....	161
TADOKORO, Tetsutaro und UGAMI, Hanako. On the cystine and cysteine contents of human hair .....	187
IWANAGA, Yoshio. Weitere Untersuchungen über den Einfluss der Splanchnikotomie auf die Zuckerausscheidungsschwelle .....	195
YAMAZAKI, Kageyu. Potentiometrie determination of cystine and cysteine .....	207
YAMAZAKI, Kageyu. Biochemical studies on the auriculoventricular junctional system of heart. II. The metabolic activity .....	223
YAMAZAKI, Kageyu. Biochemical studies on the auriculoventricular junctional system of heart. III. The phosphatide and the cholesterol content .....	235

YAMAZAKI, Kageyu. Biochemical studies on the auriculoventricular junctional system of heart. IV. Studies on the anaerobic oxidation of the auriculoventricular junctional system .....	241
SAKUMA, Futoshi. Studies on glyoxalase .....	247

## No. 3, October, 1930

SASO, Takeshi. On the behaviour of blood water during asphyxia ....	281
SHIONO, Masaie. On the nature of the effect of the addition of salt upon the surface tension of sodium taurocholate solution .....	317
MALHOTRA, R. C. Microchemical study of hemicellulose in some plant cells, with special reference to its distribution in the protoplasm.....	341
KIMURA, Hitoshi. On the degree of oxidation going on within the animal body under several conditions .....	351
TAKU, Aijiro. Die Splanchnikotomie und die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung .....	371
FUZITA, Sei. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel.—IX. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Zuckerassimilation. (II) .....	383
HOSIZIMA, Tadao; TAKATA, Hiroshi; URAKI, Ziro und SIBUYA, Sigetosi. Über Tauroisolithocholsäure aus Hühnergalle .....	393
NAKAGAWA, Satosu und FUJIKAWA, Hosaburo. Eine neue quantitative Mikrobestimmungsmethode der Gallensäure in der Galle .....	399
TANIDA, Juzaburo. The electrode potentials of the silver halide electrodes against a mixture of different halide solutions .....	411
ÔHATA, Shinsuke. Studies in experimental scurvy. X. On the adrenaline content in suprarenals and the amount of the adrenaline like substance in the serum of guinea pigs fed on a Vitamin C free diet....	419
SASAKI, Takaoki und OTSUKA, Ichiro. Beiträge zur Kenntnis der chemischen Konstitution und der biologischen Wirkung: Über amyostatische Gifte (I. Mitteilung) .....	429
SAGARA, Jun-ichiro. Zur Kenntnis der vergleichenden Biochemie. VII. Zur Chemie der besonderen Saké-Hefen .....	459
SAGARA, Jun-ichiro. Über die Spaltungsprodukte des Kapseleiweisses von Hemifusus tuba Gmel .....	471
NAKAMURA, Yasuo. Beiträge zur Kenntnis der Natur des nach Einnahme von Chlorophyll im Urin auftretenden Porphyrins .....	475

# EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GLYKOGENBILDUNG IN DER LEBER MIT HILFE VON DURCHBLUTUNGSVERSUCHEN BEI KÜNSTLICH HERVORGERUFENEM FIEBER.

## II. MITTEILUNG.

VON

TSUNAMOTO IMAZU.

*(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. R. Inada, Kaiserliche  
Universität zu Tokyo.)*

(Eingegangen am 12. February 1930.)

In der vorangehenden Mitteilung habe ich erwähnt, dass ich mit Hilfe von Durchblutungsversuchen an Hunden, bei denen durch Typhus-, Dysenterievaccin oder Tetrahydro- $\beta$ -naphthylamin eine Temperatursteigerung von über 1°C erzeugt wurde, eine deutliche Störung der Glykogenstapelung in der Leber konstatierte.

Hier bleibt aber die Frage noch offen, ob der mangelhafte Glykogenansatz beim Fieber wesentlich auf der Funktionsstörung der Leberzellen oder auf der Veränderung der Blutmischung beruht. Diese Frage sicher zu entscheiden, habe ich auf Anraten und unter der Leitung von Prof. R. Inada und Prof. K. Sakaguchi einen Kreuzversuch angestellt, indem ich einmal die Leber des fiebernden Hundes mit dem Blute eines gesunden Tieres und andererseits die Leber eines gesunden Hundes mit dem Blute des Fiebertieres unter Zusatz von reichlichem Traubenzucker künstlich durchblutete. Über die zentrale wie periphere Wirkung des Tetrahydro- $\beta$ -naphthylamins gibt es eine Anzahl Forschungen von verschiedenen Seiten.

Hier sei nur erwähnt, dass vor kurzem Iwasawa (1928) in unserem Laboratorium den Einfluss des Fiebers auf den Zuckerstoffwechsel des Lebergewebes studierte und fand, dass ein Fieber-

anstieg eine Verminderung der anaeroben Glykolyse der Leberzellen verursacht, während die Respiration der Leberzellen gesteigert oder nicht beeinflusst gefunden wurde.

#### A. GLYKOGENBILDUNG IN DER LEBER DES FIEBERNDEN TIERES BEI DER DURCHBLUTUNG MIT DEM NORMALEN BLUT.

Bei diesen Versuchen ging ich so vor, dass ich durch subcutane Zufuhr von Tetrahydro- $\beta$ -naphthylamin beim Hunde eine Temperatursteigerung von über  $1^{\circ}\text{C}$  hervorrief und dessen Leber mit dem Blute des anderen normalen Tieres unter dem Zusatz einer glukosereichen Barrenscheenschen Lösung künstlich durchblutete, indem ich dabei den Durchblutungsapparat von Yamakawa mit Mizukis Pumpe in Anwendung nahm.

Der Glykogengehalt der Leber wurde direkt vor und nach einer halbstündigen Durchblutung mit Mōri-Iwasakis Methode bestimmt. Hier betrug der Anstieg der Körpertemperatur von  $1.4^{\circ}\text{C}$  bis  $4.7^{\circ}\text{C}$  und die relative Zunahme des Glykogengehaltes der Leber 16% (minimum) bis 63.7% (maximum), durchschnittlich 33.8%. Dieser Wert ist bedeutend kleiner als die in der vorangehenden Mitteilung angegebene Mittelzahl beim normalen Hunde (112.3%), was beweist, dass die Glykogenbildungsfähigkeit der Leberzellen bei diesem künstlich erzeugten Fieber deutlich gestört ist.

Die einzelnen Daten sind in der Tabelle I. verzeichnet.

#### B. GLYKOGENBILDUNG IN DER NORMALEN LEBER BEI DER DURCHBLUTUNG MIT DEM BLUTE DES FIEBERNDEN TIERES.

Bei diesem Versuche wurde die Leber des gesunden Hundes mit dem Blute des mit Tetrahydro- $\beta$ -naphthylamin injizierten Fiebertieres durchblutet.

Die Temperatursteigerung der drei Fiebertieren betrug hier  $1.1^{\circ}\text{C}$ – $1.6^{\circ}\text{C}$  und die relative Zunahme des Leberglykogens nach

TABELLE I.

Hunde-Nr.	Datum 1929	Geschlecht	Körpergewicht (kg)	Körpertemperatur vor der Injektion	Körpertemperatur nach der Injektion	Zunahme der Körpertemperatur	Tetrahydro- $\beta$ -naphthylamin (cem.)	Durchblutung	Lebergewicht(g)	Glykogengehalt der Leber		
										%	(g)	Zunahme
										%	(g)	%
I	26/V	♀	14.5	38.4	43.1 n 2½ std.	4.7	0.3	vor nach	353 713	1.77 1.07	6.25 7.25	1.0 16.0
II		♂	15.5	38.5								
III	9/VI	♂	16.5	38.5	41.8 n 1½ std.	3.3	0.25	vor nach	595 885	1.1 0.9	6.54 7.93	1.42 21.7
IV		♀	12.0	38.9								
V	30/VI	♀	17.0	38.3	39.7 n 2½ std.	1.4	0.2	vor nach	604 1036	0.89 0.85	5.38 8.81	3.43 63.7
IV		♂	19.8	38.7								
Durchschnittszahl										33.8		



der Durchblutung 65.2% (minimum) bis 225% (maximum), durchschnittlich 139%.

Dieser Befund beweist, dass die Glykogenbildung in der Leber bei dieser Versuchsanordnung gar nicht gestört ist, und dass eine etwaige Veränderung der Blutmischung mit der Herabsetzung der glykogenbildenden Fähigkeit der Leber nichts zu tun hat.

Die einzelnen Daten sind in der Tabelle II. verzeichnet.

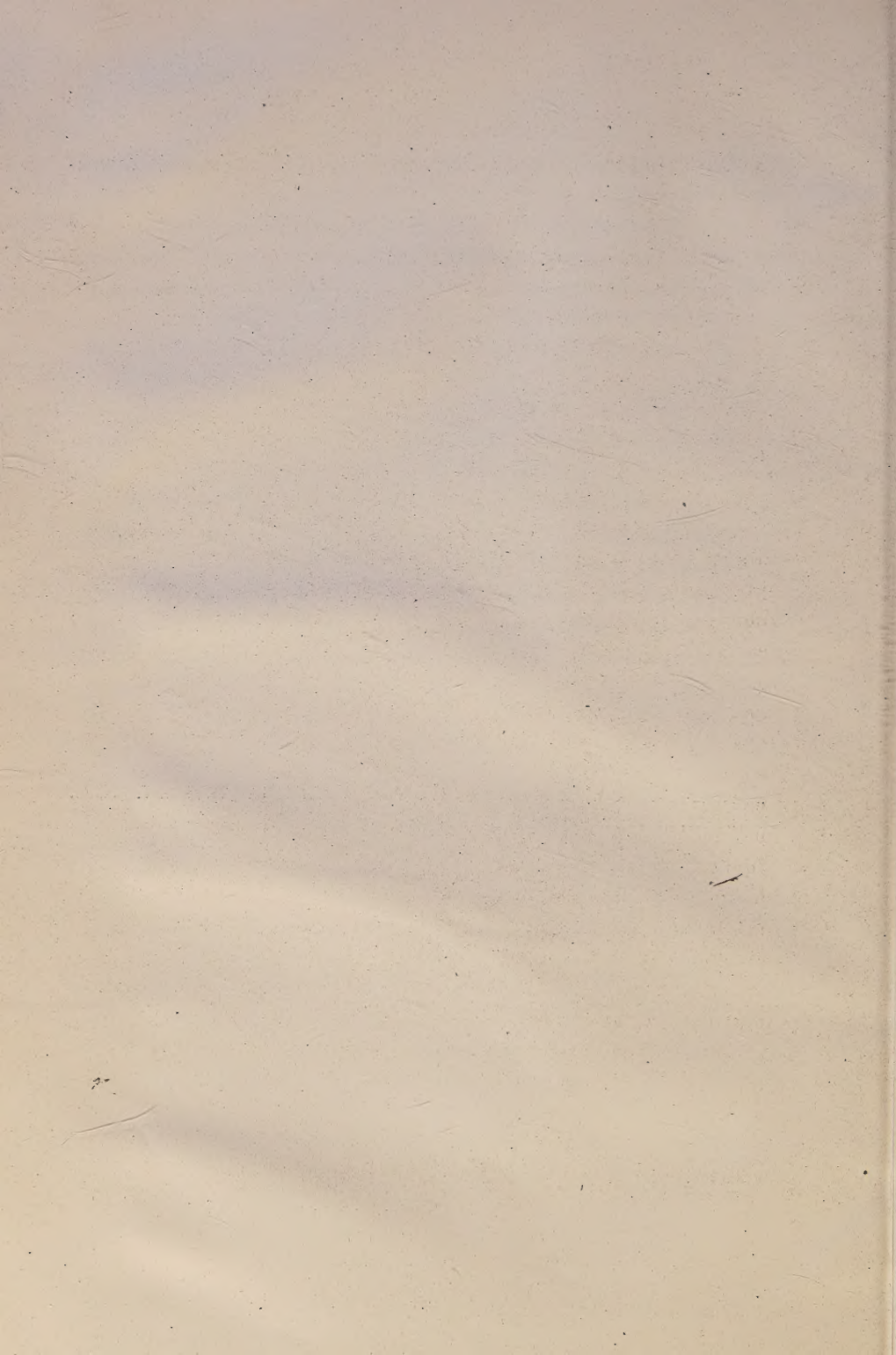
#### KURZE ZUSAMMENFASSUNG.

Die mangelhafte Glykogenbildung in der Leber, welche beim durch Tetrahydro- $\beta$ -naphthylamin am Hunde künstlich erzeugten Fieber deutlich beobachtet wird, ist hauptsächlich auf die Funktionschädigung der Leberzellen selbst und nicht auf die veränderte Blutmischung zurückzuführen.

Zum Schlusse spreche ich unserem hochverehrten Chef der Klinik, Herrn Prof. R. Inada, und Herrn Prof. K. Sakaguchi für ihre freundliche Leitung bei dieser Arbeit meinen herzlichen Dank aus.

#### LITERATUR.

- Iwasawa, H. (1928): Proceedings of the Imperial Academy, 4, No. 7. p. 425.  
Imazu, T. (1929): The Journal of Biochemistry 11, No. 1, p. 1.



## A METHOD OF ESTIMATING THE NET VOLUME OF PRECIPITATED PROTEINS IN THE ALBUMINURIA.

By

KIKUZIRO INOUE.

*(From the 1st Division of the Institute of Physiology and the 2nd Clinic for  
Internal Medicine. Directors: Prof. R. Shoji and Prof. I. Matsuo,  
Kyoto Imperial University.)*

(Received for publication, February 17, 1929.)

### INTRODUCTION.

In the well-known Esbach method and similar methods, viz., Tsuchiya's and Sueyoshi's, the proteins of an albuminuric urine precipitated by the respective reagents are left standing for 24 hours to settle, and the volume of the sediment is read off at the end of this time.

It is, however, rather inconvenient to wait for such a long time, and, moreover, it includes several sources of error. Sedimentation of the precipitate is not yet complete at this time of reading. According to our test experiments, it requires 3 days by Sueyoshi's method, and 4 or 5 days by Esbach's as well as by Tsuchiya's method, before the volume of the sediment becomes constant, so that no further shrinkage of it is appreciable. Thus the end of 24 hours, when the reading is taken, is, to speak accurately, an intermediate period during sedimentation, though near the end; and obviously the reading is influenced by the sedimentation velocity, which is largely influenced in turn by the specific gravity of the medium, size of the precipitate, and the temperature. Even at the end of complete sedimentation, the volume of the sediment read off is not the net volume of the precipitated proteins, but it includes some interstitial spaces between the particles of the precipitates, which spaces may again be influenced by the factors mentioned above.

So far as I know, Aufrecht is the first who applied centrifuging to Esbach's estimate. It is, however, to be regretted that he reported centrifuging the precipitates for only 2 minutes, and no other conditions. Later, Strzyzowski did the same and discussed several points in connection with the method. He centrifuged the sample precipitated by Esbach's reagent for 15 minutes by means of an electromotor centrifuge of a certain diameter with a speed of 2000 revolutions per minute, and yet he noticed the influence of the specific gravity of the medium, and also of the temperature. The influence of the specific gravity was so marked that he first raised the specific gravity of the urine to about 1.030, by dissolving a suitable amount of NaCl, and yet the measure of one and the same urine varied according to a slight variation in its specific gravity. Then, in order to raise its specific gravity to a further extent, he mixed into the urine thus concentrated a  $\text{ZnSO}_4$ -solution of a specific gravity of 1.300 in a ratio of 5 cc. of the former to 2 cc. of the latter. As to the temperature effect, he observed that the volume decreased with increased temperature, and he composed a table empirically, by which one may find the percentage figure corresponding to the reading at each temperature of from  $20^\circ\text{C}$  to  $25^\circ\text{C}$ . Further, he noted that the variations in the centrifugal force, which is a function of the speed of revolution and the radius of the centrifuge, may influence the result, and accordingly he chose the revolution number as 2000 per minute with his centrifuge.

Strzyzowski's descriptions suggest that his result was influenced by so many of the factors mentioned above, because his reading was not the net volume of the precipitates alone, but included some interstitial spaces which were the subject suffering from the influence of these factors. If the net volume of the precipitates be measured, it should be a constant, free from the influence of the factors mentioned above.

Our interest was directed toward estimating the net volume of the precipitates in a short time. If the precipitates be of a crystalline nature, it would be impossible so perfectly to compress them

together as wholly to eliminate the interstitial spaces. Fortunately, however, the protein precipitates are a hydrophilic gel, so that the elimination of the interstitial spaces is capable of attainment.

The problem seems to be somewhat similar to the estimation of the net volume of corpuscles in blood, which was studied by Hirota in our Institute. He centrifuged a blood sample for successive intervals of time and read off the volume of the corpuscular sediment at the end of each interval, and found that the reading at any period,  $V_t$ , is related to the total time of centrifuging till that time,  $t$ , by an empirical equation,

$$V_t = \frac{t}{a + b(t - t_1)},$$

where  $t_1$  is the first interval of centrifuging, and  $a$  and  $b$  each a constant. Putting  $t = \infty$  in this equation, we have

$$V_\infty = \frac{1}{b}$$

where  $V_\infty$  is obviously the volume when centrifuging is carried on for an infinite length of time. Therefore, this is the net volume of the corpuscles, under the condition that the centrifugal force is

strong enough to deform the corpuscles to eliminate the interstitial spaces completely. In fact, there is a limiting revolution number for a centrifuge, above which  $V_\infty$  is independent of the revolution number.

Our present intention is to test if this empirical equation be applicable to the sediment of proteins precipitated from an albuminuric urine by the reagent of Esbach, of Tsuchiya or of Sueyoshi.

#### METHODS.

The sedimentation tube is sketched in Fig. 1. The lower and narrow part of the tube is 4.5 cm. long with a 3 mm. bore, which is graduated in 100 divisions. One division was found by calibration to correspond to  $3.2 \times 10^{-3}$  cc. The upper part



Fig. 1.

is of 1.4 cm. bore and 5 cm. long including the contracting part, and has a capacity of about 6 cc.

This tube was designed to fit the centrifuge tube of ordinary small size. The amount of urine for this tube is 2.50 cc. (or less when the urine is extremely rich in protein).

Reagents were prepared as follows:

a). Esbach's reagent: 10 gm. picric acid and 20 gm. citric acid are dissolved in 800 cc. boiling water, made up to exactly 1 litre. 2.00 cc. reagent is added to 2.50 cc. urine (urine 10: reagent 8). Alkaline or neutral urine is previously acidulated with acetic acid.

b). Tsuchiya's reagent: 1.0 gm.\* phosphotungstic acid and 5.0 cc. conc. hydrochloric acid (sp. gravity 1.15) is dissolved in 100 cc. alcohol (96 vol %). 2.22 cc. reagent to 2.50 cc. urine (urine 9: reagent 8).

c). Sueyoshi's reagent: 20 gm.  $\text{HgCl}_2$  is dissolved in 10 cc.  $\text{HCl}$  (sp. gravity 1.15). 5 gm.  $\text{KBr}$  is dissolved in 70 cc. Water. The two solutions are mixed and it is made up to 100 cc. with alcohol. 2.14 cc. reagent to 2.50 cc. urine (urine 7: reagent 6).

Albuminuric urines used in this research were collected from in-patients of Prof. Matsuo's clinic.

Procedure of estimation: a definite amount of either one or the other of the reagent mentioned above is poured into the tube. Usually it does not run into the narrow part, but remains in the upper part. If a drop does run into the former, it does not harm the result. Then 2.50 cc. urine is added to it, and mixed well by shaking some 30 times. The tube thus prepared is mounted on an electromotor centrifuge. Our centrifuge was driven by our private source of 110-volt accumulators and revolves with a maximum of 3800 revolutions per minute. By means of adjusting the rheostat, the speed can naturally be regulated as desired, below this maxi-

---

\* 1.5 gm. in the original report. Later this was altered to 1.0 gm by Tsuchiya himself.

mum speed. In the present experiment, each time interval of the revolutions was taken for 10 minutes, which is measured exactly from the switching on of the driving current to the switching off of it. Care should be taken in making the circuit to turn the crank of the rheostat to reach the required knob in the same number of second every time. In other words, the centrifuge is driven first for 10 minutes, and after the revolution has died down of itself (artificial stoppage may disturb the result), the volume of the sediment is read off. This procedure is repeated successively five times or so. With the aid of a magnifying lens or a horizontal microscope used for Ostwald's capillary electrometer, the reading can be taken exactly to one-tenth of one division. However, the latter is superfluous for clinical purposes.

As was noticed in the introduction, the revolution time,  $t$ , corresponding to any reading  $V_t$ , is the sum of the time of successive revolutions.

Thus,  $V_t$  at  $t=30'$  is the reading taken at the end of the third interval of revolution, each interval being 10 minutes long in our experiment. Naturally the length of each interval can be taken arbitrarily. Our choice of ten minutes was only for convenience' sake in calculation.

All treatments were carried out at room temperature, which was noted every time.

## EXPERIMENTS.

### *I. Applicability of the empirical equation.*

In order to test the applicability of the equation

$$V_t = \frac{t}{a + b(t - t_1)},$$

it is convenient to rewrite it to

$$\frac{t}{V_t} = a + b(t - t_1),$$

or simply

$$\frac{t}{V_t} = a' + bt,$$

Plotting  $t/V_t$  against  $t$ , we could have a straight line in every case, showing the undoubted applicability of the equation.

The constant  $b$  is the tangent of the angle held between this line and the abscissa, so that it can be estimated on the graph, or more exactly by means of the method of least squares. Comparing the values of  $b$  found by these two methods, it was found that the graphical method was satisfactory in every case.

The justification of the application of the equation can be seen in three examples given in Table 1. Here the constants  $a$  and  $b$  were calculated by means of the method of least squares, and then the value of  $V_t$  for each  $t$  was calculated by the original equation, applying these data of  $a$  and  $b$ . The coincidence of the values of  $t/V_t$  thus calculated with those obtained directly from observed data is quite satisfactory. See also Fig. 2, where  $t/V_t$  plotted against  $t$ , gives a straight line.

## II. *Effect of revolution speed.*

The centrifugal force acting on the sediment is proportional to the radius of circular movement of the subject and also to the square of the angular velocity of revolution.

The radius is decided by the construction of the centrifuge. In our instrument, it is 13 cm. to the bottom of the tube, and can not be altered. On the other hand, the angular velocity can be altered as desired by altering the revolution number of centrifuging. Considered theoretically, there should be a limiting revolution number. Below this speed the value of  $V_\infty$  would increase with a decreased revolution number, as the centrifugal force in this case is not sufficient to overcome the resistance of the precipitates against the complete compression. Above this limiting speed, however,  $V_\infty$  must be independent of the revolution number, as the precipitates are compressed completely and no more interstitial space exists.

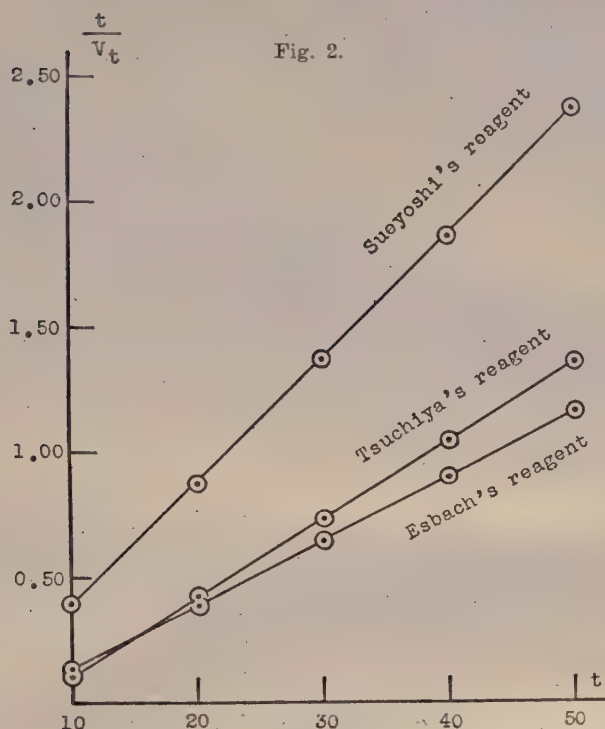


TABLE I.

	I. Esbach's reagent. Revol. 3500/min.			II. Tsuchiya's reagent. Revol. 3500/min.			III. Sueyoshi's reagent. Revol. 3500/min.		
$t$ (min.)	$V_t$	$t/V_t$		$V_t$	$t/V_t$		$V_t$	$t/V_t$	
		observed	calculated		observed	calculated		observed	calculated
10	70.5	0.141	0.136	84.8	0.117	0.115	24.7	0.404	0.391
20	51.4	0.389	0.394	46.7	0.427	0.428	22.8	0.876	0.837
30	46.3	0.647	0.652	40.7	0.736	0.740	21.7	1.380	1.382
40	44.0	0.908	0.909	37.9	1.055	1.053	21.5	1.863	1.878
50	42.6	1.173	1.167	36.6	1.366	1.365	20.9	2.388	2.373
$\infty$	38.7	$a=0.1362$ $b=0.02377$		32.3	$a=0.1150$ $b=0.03126$		20.2	$a=0.3912$ $b=0.04955$	

(The urines for different reagents are different.)

This supposition was verified by experiments, of which the results are given in Table II. Here we see that, with Esbach's or Tsuchiya's reagent,  $V_{\infty}$  is independent of the revolution number at a speed of above 2500 per minute. With Sueyoshi's reagent this limiting revolution number is 2000 per minute.

This limiting speed of the revolutions will naturally be different with a centrifuge of a different diameter from ours, though the relation of them for the three mentioned reagents will be the same.

TABLE II.

Revolution number per minute	$V_{\infty}$ with Esbach's reagent	$V_{\infty}$ with Tsuchiya's reagent	$V_{\infty}$ with Sueyoshi's reagent
1500	40.8 (23°C)	34.2 (20°C)	23.7 (25°C)
1700	41.0 (27° )	33.7 (23° )	21.2 (25° )
2000	39.5 (25° )	32.9 (27.5°)	20.2 (27° )
2500	38.8 (27° )	32.0 (25° )	20.2 (26° )
3000	38.8 (22° )	32.0 (20° )	20.2 (26° )
3500	38.8 (22° )	32.0 (18° )	20.2 (23° )

(The urines for different reagents are different.)

### III. Influence of temperature.

In Table II, we see that the values of  $V_{\infty}$  at revolution speed above the limiting speed is a good constant, though they were carried out at different temperatures; in other words, the net volume estimated by our method is independent of the temperature. This may be expected so far as our theoretical considerations are correct. Therefore our measurements were carried out at the room temperature without regulation. Further, the following experiments were performed to verify the fact that the net volume thus obtained was independent of the temperature. One and the same urine was precipitated with one reagent in several tubes separately. The  $V_{\infty}$  of each tube thus prepared was determined with the same revolu-

tion speed, viz., 3000 p.m., but at different room temperatures, between 18°C and 27°C, which were adjusted artificially. Results are summarized in Table III, which verifies the fact undoubtedly, that  $V_{\infty}$  is free from any influence of the temperature.

TABLE III.

Esbach's reagent		Tsuchiya's reagent		Sueyoshi's reagent	
Temp.	$V_{\infty}$	Temp.	$V_{\infty}$	Temp.	$V_{\infty}$
18°C	78.1	78°C	38.7	20°C	23.0
21	78.8	20	38.6	22	23.0
23	78.7	23	38.6	26	23.0
25	78.2	25	38.7		
27	78.2	27	38.8		
mean →	78.4		38.7		23.0

(The urines for different reagents are different.)

#### IV. Influence of specific gravity.

So long as the value of  $V_{\infty}$  thus obtained is free from interstitial spaces, it should be independent of the specific gravity of the medium. In order to verify this, the following experiments were carried out.

A urine was divided up into several portions. Each portion was diluted with distilled water in varied proportions, namely, to  $\frac{2}{3}$ ,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$ , etc., of its original concentration, one being left undiluted. The specific gravity of each sample, as well as its protein content, was lowered according to its dilution. Each sample was treated as described above and it was found that the  $V_{\infty}$  of each sample was diminished exactly corresponding to its dilution. The results are summarized in Table IV. From these results, we see that, when the protein content of the urine is too abundant to be measured with the tube, it is to be estimated after being diluted to half strength or to any desired extent. Multiplying the dilution to the result obtained, we have the value of the original urine.

TABLE IV.

Reagent	Dilution urine: H <sub>2</sub> O	$V_{\infty}$ observed	$V_{\infty}$ calculated from dilution
Esbach's	1:0	35.0	—
	2:1	23.2	23.3
	1:2	11.6	11.7
Tsuchiya's	1:0	67.0	—
	1:4	13.4	13.4
	1:5	11.1	11.2
Sueyoshi's	1:0	47.0	—
	1:1	23.5	23.5
	1:3	11.8	11.8

(The urines for different reagents are different.)

*V. Comparison of the present results with those  
by the original methods.*

On carrying out the above mentioned experiments, estimates by the respective original methods were also made. A comparison of these two kinds of data are summarized in Table V. In cases where parallel estimates by the original methods were carried out, the mean value is given with the number of estimates in parentheses. In the fourth column of the table is given the quotient of the concentration in ‰ (found by original methods) divided by  $V_{\infty}$ . This is the factor to be multiplied to  $V_{\infty}$ , in order to convert it to the value of concentration in ‰. Taking the mean for each reagent we found 0.10 for Esbach's, 0.11 for Tsuchiya's and 0.25 for Sueyoshi's. In other words, 10 divisions of our tube correspond to 1‰ when Esbach's reagent is used, 9 divisions to 1‰ with Tsuchiya's, and 4 divisions to 1‰ with Sueyoshi's.

The scale of our tube is rather arbitrary, so that it is rigorous to convert  $V_{\infty}$  into the absolute amount, which is obtainable by multiplying  $3.2 \times 10^{-3}$  cc. to  $V_{\infty}$  (see p. 9 supra). If we want to

calculate the amount of precipitate in volume percentage of the original urine, it is given by  $V_{\infty} \times \frac{3.2 \times 10^{-3}}{2.5} \times 100$ , where 2.5 is the amount of urine taken for estimation. The data are given in the sixth column of the Table. Then, the ratio of the concentration (in %) to the Vol. % is given in the seventh column. This is the factor to multiply to the data of Vol %, when the conversion of Vol. % into the concentration value is wanted. This is the general factor, independent of the size of the tube. This factor is 0.76 for Esbach's reagent 0.88 for Tsuchiya's and 1.95 for Sueyoshi's. These factors are provisional for clinical purposes. Accurate data of these, checked by exact protein determinations, as well as a discussion on the superiority or inferiority of the three reagents will be given in a report to follow.

TABLE V.

Reagent	Concentration estimated by original method (%)	$V_{\infty}$ (Scale on the tube)	Conc. $\frac{V_{\infty}}{V_{\infty}}$	Absolute amount of precipitate (cc.)	Amount of precipitate in Vol. % of urine	Conc. (%) $\frac{\text{Conc.}}{\text{Vol. \%}}$
Esbach's	3.8 <sub>0</sub> (3)	38.8	0.10	0.124	4.97	0.76
	7.8 <sub>0</sub> (5)	78.4	0.10	0.251	10.04	0.78
	3.5	35.0	0.10	0.112	4.48	0.78
	2.4	23.2	0.10	0.074 <sub>3</sub>	2.97	0.81
	1.0	11.6	0.09	0.037 <sub>1</sub>	1.49	0.67
	mean		0.10		mean	0.76
Tsuchiya's	3.5 <sub>7</sub> (3)	32.0	0.11	0.102	4.10	0.87
	4.2 <sub>0</sub> (5)	38.7	0.11	0.124	4.95	0.85
	7.6	67.0	0.11	0.214	8.58	0.89
	1.5	13.4	0.11	0.042 <sub>2</sub>	1.71	0.88
	1.3	11.1	0.12	0.035 <sub>5</sub>	1.42	0.91
	mean		0.11		mean	0.88
Sueyoshi's	5.1 <sub>3</sub> (4)	20.2	0.25	0.064 <sub>0</sub>	2.59	1.98
	5.2 <sub>0</sub> (2)	23.0	0.23	0.073 <sub>3</sub>	2.94	1.77
	11.8	47.0	0.25	0.150	6.02	1.96
	6.0	23.5	0.26	0.075 <sub>2</sub>	3.01	2.00
	3.1	11.8	0.26	0.037 <sub>7</sub>	1.51	2.05
	mean		0.25		mean	1.95

*Simplified procedure for clinical purpose.*

In order to find  $V_{\infty}$ , i.e. the cotangent of the  $t/V_t-t$  line graphically for clinical purposes, the determination of the five points, as was carried out in our experiments, is not necessary, but computation from two points is sufficient. Thus, calculating  $V_{\infty}$  from the first two determinations in each of our experiments, we have satisfactory data, ( $V_{\infty}$  computed roughly), as it shown in Table VI.

TABLE VI.

Esbach's reagent		Tsuchiya's reagent		Sueyoshi's reagent	
$V_{\infty}$ computed		$V_{\infty}$ computed		$V_{\infty}$ computed	
accurately	roughly	accurately	roughly	accurately	roughly
40.8	40.3	34.2	34.0	23.7	23.8
41.0	41.3	33.7	34.1	21.2	22.4
39.5	38.2	32.9	33.0	20.2	20.2
38.8	38.6	32.0	31.3	20.2	20.2
38.8	38.9	32.0	32.3	20.2	21.2
38.8	40.3	32.0	32.3	20.2	21.2
78.1	78.7	38.7	38.8	23.0	23.2
78.7	79.4	38.6	38.9	23.0	23.3
78.7	78.7	38.6	39.4	23.0	23.7
78.2	78.7	38.7	39.7	47.0	46.8
78.2	78.1	38.8	39.7	23.5	23.6
35.0	34.9	67.0	66.7	11.8	11.7
23.1	23.2	13.4	13.3		
11.6	11.6	11.1	11.1		

Therefore, the procedure of the estimation for clinical purposes can be simplified as follows:

A suitable amount of a reagent (2 cc. of Esbach's reagent, 2.2 cc. of Tsuchiya's, or 2.1 cc. of Sueyoshi's) is put into a tube such as described above. Add to it 2.50 cc. of the urine to be analysed, and mix them thoroughly. Centrifuge the tube for 10 minutes with a constant speed of more than 2500 revolutions per

minute (with a radius of 13 cm. or more from the axis of the centrifuge to the bottom of the tube in a horizontally revolving position). The time of centrifuging is measured exactly from the moment of switching on to the moment of switching off. Let the centrifuge come to a stop by itself, and then read the volume of the sediment,  $V_1$ , on the scale of the tube. Next, repeat the centrifuging for another 10 minutes, and read the volume  $V_2$  as before. Then we have

$$\frac{10}{\frac{20}{V_2} - \frac{10}{V_1}} = V_{\infty} \text{ (net volume of the precipitates).}$$

On the other hand, calibrate the tube by weighing mercury put in the graduated part of the tube, and find out the volume  $A$  cmm. (3.2 cmm. for our tube), corresponding to 1 division, and calculate the factor  $F$  specific to the tube.

$$F = 0.10 \times \frac{A}{3.2}, \text{ when Esbach's reagent is used;}$$

$$F = 0.11 \times \frac{A}{3.2}, \text{ when Tsuchiya's reagent is used;}$$

$$F = 0.25 \times \frac{A}{3.2}, \text{ when Sueyoshi's reagent is used.}$$

Then  $F \times V_{\infty}$  is the concentration of the coagulable proteins in the urine expressed in %.

#### SUMMARY.

Proteins contained in a pathological urine, being precipitated either with Esbach's reagent, or with Tsuchiya's or with Sueyoshi's and the precipitates being centrifuged in a graduated tube for any time  $t$ , and its volume,  $V_t$ , read off, the empirical equation,

$$V_t = \frac{t}{a + bt},$$

was found to apply to the result.

Putting  $t = \infty$  in this equation,

$$V_{\infty} = \frac{1}{b}$$

is the volume  $V$  when it is centrifuged for an infinitely long time. When the centrifugal force applied is strong enough to deform the precipitates and to eliminate interstitial spaces between the precipitates,  $V_{\infty}$  thus obtained, is the net volume of the precipitates. This force was found to be supplied when a centrifuge (radius to the bottom of the tube is 13 cm. long) was driven with a speed of more than 2000 revolutions per minute for Sueyoshi's reagent, and 2500 p.m. for Esbach's as well as for Tsuchiya's.

Factors were computed which are to be multiplied to the  $V_{\infty}$  thus obtained, in order to convert it to the protein content in %, or to the volume percentage of the original urine.

#### REFERENCES.

- Aufrecht (1909): Deutsche med. Wochenschr., **35**, 2018.  
Hirota, K. (1925): Journ. of Biophys., **1**, 233, see also ditto, **2**, 283 (1927).  
Strzyzowski (1913): Zeitschr. f. physiol. Chem., **88**, 25.  
Sueyoshi, Y. (1915): Mitteil. med. Fakultät d. Kais. Univ. zu Tokyo, **14**, 441.  
Tsuchiya, I. (1908): Zentralbl. f. inn. Med., **29**, 105 u. 608.

Protocol 1. Same urine precipitated with Esbach's reagent.  
Estimation by original method: 3.9, 3.6, 3.9% (3 parallel estimations).

$t$ (min.)	1500 rev./m. 23°C.		1700 rev./m. 27°C.		2000 rev./m. 25°C.		2500 rev./m. 27°C.		3000 rev./m. 22°C.		3500 rev./m. 22°C.	
	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$
10	99.0	0.101	91.9	0.104	92.6	0.107	83.7	0.119	75.6	0.132	70.5	0.141
20	57.2	0.349	57.8	0.346	54.2	0.369	52.8	0.378	51.3	0.389	51.4	0.389
30	50.8	0.590	51.0	0.588	48.6	0.616	47.1	0.636	46.3	0.647	46.3	0.647
40	47.8	0.836	47.6	0.839	45.9	0.870	44.7	0.895	44.7	0.894	44.0	0.908
50	46.1	1.084	46.4	1.078	44.6	1.122	43.5	1.149	42.8	1.167	42.6	1.173
	$a = 0.1014$ $b = 0.02453$ $V_{\infty} = 40.76$		$a = 0.1028$ $b = 0.02441$ $V_{\infty} = 40.96$		$a = 0.1106$ $b = 0.02531$ $V_{\infty} = 39.51$		$a = 0.1200$ $b = 0.02577$ $V_{\infty} = 38.80$		$a = 0.1308$ $b = 0.02575$ $V_{\infty} = 38.83$		$a = 0.1362$ $b = 0.02577$ $V_{\infty} = 38.80$	

Protocol 2. Same urine precipitated with Tsuchiya's reagent.  
Estimation by original method: 3.5, 3.6, 3.6% (3 parallel estimations).

$t$ (min.)	1500 rev./m. 20°C.		1700 rev./m. 23°C.		2000 rev./m. 27.5°C.		2500 rev./m. 25°C.		3000 rev./m. 20°C.		3500 rev./m. 18°C.	
	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$
10	93.9	0.106	92.5	0.108	90.9	0.109	88.2	0.113	86.5	0.115	84.8	0.117
20	50.0	0.400	49.8	0.401	48.5	0.412	46.1	0.433	47.0	0.425	46.7	0.427
30	43.0	0.697	42.8	0.700	41.8	0.717	40.3	0.743	39.7	0.755	40.8	0.736
40	40.8	0.981	40.1	0.998	38.9	1.029	37.3	1.073	38.0	1.051	37.9	1.055
50	39.1	1.278	38.6	1.294	37.8	1.321	36.8	1.357	37.0	1.351	36.6	1.366
	$a = 0.1074$ $b = 0.02925$ $V_{\infty} = 34.18$		$a = 0.1064$ $b = 0.02969$ $V_{\infty} = 33.68$		$a = 0.1094$ $b = 0.03041$ $V_{\infty} = 32.88$		$a = 0.1182$ $b = 0.03128$ $V_{\infty} = 31.96$		$a = 0.1127$ $b = 0.03135$ $V_{\infty} = 32.00$		$a = 0.1150$ $b = 0.03126$ $V_{\infty} = 31.98$	

## Protocol 3. Same urine precipitated with Sueyoshi's reagent.

Estimation by original method: 5.0, 5.2, 5.2, 5.1% (4 parallel estimations).

$t$ (min.)	1500 rev./m. 25°C.		1700 rev./m. 25°C.		2000 rev./m. 27°C.		2500 rev./m. 26°C.		3000 rev./m. 26°C.		3500 rev./m. 23°C.	
	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$
10	41.6	0.240	38.1	0.262	35.8	0.279	31.0	0.322	27.0	0.370	24.7	0.404
20	30.2	0.661	28.2	0.708	25.8	0.774	25.6	0.781	23.7	0.840	22.8	0.876
30	27.9	1.076	26.1	1.151	23.5	1.278	22.8	1.314	22.8	1.318	21.7	1.380
40	26.4	1.513	24.9	1.606	22.7	1.759	22.4	1.785	21.7	1.840	21.5	1.863
50	26.0	1.926	23.7	2.167	22.0	2.272	21.7	2.304	21.3	2.351	21.0	2.383
	$a = 0.2384$ $b = 0.04224$ $V_{\infty} = 23.67$		$a = 0.2372$ $b = 0.04708$ $V_{\infty} = 21.24$		$a = 0.2820$ $b = 0.04952$ $V_{\infty} = 20.19$		$a = 0.3126$ $b = 0.04943$ $V_{\infty} = 20.23$		$a = 0.3522$ $b = 0.04960$ $V_{\infty} = 20.16$		$a = 0.3912$ $b = 0.04935$ $V_{\infty} = 20.18$	

## Protocol 4. Same urine precipitated with Esbach's reagent.

Revolution speed 3000 per minute.

Estimation by original method: 7.8, 8.0, 8.0, 7.8, 7.6% (5 parallel estimations).

$t$ (min.)	18°C.		21°C.		23°C.		25°C.		27°C.	
	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$
10	98.5	0.101	98.8	0.101	98.6	0.101	98.7	0.101	98.7	0.101
20	87.5	0.228	87.7	0.227	87.4	0.228	87.5	0.228	87.3	0.229
30	83.6	0.358	83.6	0.358	83.6	0.358	83.6	0.358	83.3	0.360
40	82.5	0.485	83.2	0.481	82.8	0.483	82.5	0.484	82.5	0.484
50	81.5	0.613	82.7	0.604	82.1	0.609	81.6	0.612	81.5	0.613
	$a = 0.1008$ $b = 0.01281$ $V_{\infty} = 78.06$		$a = 0.1002$ $b = 0.01270$ $V_{\infty} = 78.74$		$a = 0.1016$ $b = 0.01271$ $V_{\infty} = 78.69$		$a = 0.1010$ $b = 0.01278$ $V_{\infty} = 78.24$		$a = 0.1016$ $b = 0.01279$ $V_{\infty} = 78.18$	

## Protocol 5. Same urine precipitated with Tsuchiya's reagent.

Revolution speed 3000 per minute.

Estimation by original method: 4.0, 4.3, 4.2, 4.2% (5 parallel estimations).

$t$ (min.)	18°C.		20°C.		23°C.		25°C.		27°C.	
	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$
10	74.0	0.135	73.9	0.135	74.0	0.135	74.8	0.133	74.6	0.134
20	50.8	0.393	51.0	0.392	51.3	0.389	51.9	0.385	51.7	0.386
30	46.1	0.650	45.9	0.653	46.0	0.652	45.8	0.655	45.7	0.656
40	44.0	0.909	43.9	0.910	44.0	0.909	44.1	0.907	44.1	0.906
50	42.8	1.169	42.7	1.172	42.7	1.172	43.0	1.163	43.1	1.161
	$a = 0.1344$ $b = 0.02584$ $V_\infty = 38.70$		$a = 0.1340$ $b = 0.02592$ $V_\infty = 38.58$		$a = 0.1326$ $b = 0.02394$ $V_\infty = 38.55$		$a = 0.1322$ $b = 0.02582$ $V_\infty = 38.73$		$a = 0.1338$ $b = 0.02574$ $V_\infty = 38.84$	

## Protocol 6. Same urine precipitated with Sueyoshi's reagent.

Revolution speed 3000 per minute.

Estimation by original method: 5.2, 5.2% (2 parallel estimations).

$t$ (min.)	20°C.		22°C.		26°C.	
	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$
10	36.6	0.273	36.6	0.273	36.9	0.271
20	28.4	0.704	28.5	0.702	28.8	0.693
30	26.3	1.140	26.4	1.136	26.5	1.133
40	25.3	1.583	25.4	1.574	25.4	1.577
50	24.8	2.016	24.8	2.013	24.9	2.005
	$a = 0.2738$ $b = 0.04357$ $V_\infty = 22.95$		$a = 0.2688$ $b = 0.04354$ $V_\infty = 22.97$		$a = 0.2654$ $b = 0.04352$ $V_\infty = 22.98$	

Protocol 7. Same urine precipitated with Esbach's reagent.  
 Revolution speed 3000 per minute.

$t$ (min.)	Undiluted urine 22°C.		Diluted urine (urine 2: H <sub>2</sub> O 1) 25°C.		Diluted urine (urine 1: H <sub>2</sub> O 2) 27°C.	
	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$
10	82.4	0.121	56.0	0.179	27.4	0.365
20	49.1	0.408	32.8	0.610	16.3	1.230
30	43.3	0.692	29.1	1.032	14.4	2.089
40	41.0	0.977	27.2	1.469	13.6	2.941
50	39.6	1.264	26.2	1.906	13.1	3.808
	$a = 0.1216$ $b = 0.02855$ $V_\infty = 35.03$ Estimation by original method: 3.5‰		$a = 0.1762$ $b = 0.04315$ $V_\infty = 23.18$ Estimation by original method: 2.4‰		$a = 0.3672$ $b = 0.08597$ $V_\infty = 11.63$ Estimation by original method: 1.0‰	

Protocol 8. Same urine precipitated with Tsuchiya's reagent.  
 Revolution speed 3000 per minute.

$t$ (min.)	Undiluted urine 23°C.		Diluted urine (urine 1: H <sub>2</sub> O 4) 25°C.		Diluted urine (urine 1: H <sub>2</sub> O 5) 26.5°C.	
	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$
10	93.5	0.107	18.7	0.534	15.5	0.642
20	77.8	0.257	15.6	1.285	12.9	1.547
30	74.0	0.405	14.7	2.037	12.4	2.427
40	72.0	0.556	14.4	2.786	12.0	3.344
50	71.0	0.704	14.2	3.521	11.8	4.252
	$a = 0.1071$ $b = 0.01493$ $V_\infty = 66.97$ Estimation by original method: 7.6‰		$a = 0.5376$ $b = 0.07475$ $V_\infty = 13.38$ Estimation by original method: 1.5‰		$a = 0.6418$ $b = 0.09008$ $V_\infty = 11.10$ Estimation by original method: 1.3‰	

Protocol 9. Same urine precipitated with Sueyoshi's reagent.  
 Revolution speed 3000 per minute.

$t$ (min.)	Undiluted urine 18°C.		Diluted urine (urine 1: H <sub>2</sub> O 1) 25°C.		Diluted urine (urine 1: H <sub>2</sub> O 3) 27°C.	
	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$	$V_t$	$t/V_t$
10	78.1	0.128	39.3	0.255	19.5	0.513
20	58.5	0.342	29.5	0.679	14.7	1.364
30	54.3	0.552	27.2	1.102	13.6	2.201
40	52.3	0.765	26.2	1.529	13.1	3.046
50	51.1	0.979	25.6	1.956	12.8	3.906
	$a = 0.1280$ $b = 0.02126$ $V = 47.04$		$a = 0.2535$ $b = 0.04253$ $V = 23.51$		$a = 0.5123$ $b = 0.08469$ $V = 11.81$	
	Estimation by original method: 11.8%		Estimation by original method: 6%		Estimation by original method: 3.1%	



## BEITRÄGE ZUR CHEMIE DER ASKARIS.

VON

SHIGEO YOSHIMURA.

*(Aus der inneren Klinik der Universität zu Nagasaki,  
Vorstand: Prof. Dr. M. Tsudji.)*

*(Eingegangen am 10. März 1930.)*

Nach der klinischen Erfahrung, sowie nach experimentellen Versuchen wirkt der Spulwurm auf den Organismus in verschiedener Weise sehr giftig ein. Flury (1912) schrieb die starke Giftigkeit den Substanzen aus der Fettsäurenreihe in der Leibeshöhlenflüssigkeit zu. Nach ihm sollten eine Base und Purinbasen, welche aus dem Askariskörper isoliert wurden, auch auf das Nervensystem sehr giftig einwirken. Vor kurzem isolierten wir (1930) aus dem wässrigen Extrakt menschlicher Spulwürmer eine mit Phosphorwolframsäure fällbare Basenfraktion, welche, Kaninchen subkutan injiziert, hochgradige Anämie, starke Eosinophilie und vermehrte Globulinfraktion im Serum hervorrief. Es ist leicht ersichtlich, dass diese toxisch wirksamen Substanzen in einem ursprünglichen Zusammenhang mit den Bestandteilen der Würmer stehen. 1912 nahm Flury zuerst ausreichende Untersuchungen an Würmern nach rein chemischen Grundsätzen vor. Was die stickstoffhaltigen Substanzen anbetrifft, so hatte er die verschiedenen Aminosäuren, die Hexonbasen und die Purinbasen in einer geringen Menge isoliert, jedoch so, dass die Identifizierung nach ihm meist nur durch Schmelzpunktmessung der Substanzen geschah. Über das Wesen der Giftigkeit der Spulwürmer gibt er noch keine klare Erklärung. Wenn man die Mannigfaltigkeit der klinischen Symptome in Erwägung zieht, welche bei Spulwürmerinfektion vorkommen, so unterliegt es keinem Zweifel, dass die Intoxikation nicht nur durch eine Substanz verursacht wird. Aus diesem

Grunde wollte ich die giftig wirkenden Substanzen in verschiedenen stickstoffhaltigen Verbindungen suchen. Zunächst habe ich die stickstoffhaltigen Bestandteile von Askaris mit einer genaueren Methode untersucht.

# I. HYDROLYSE DER SPULWÜRMER DURCH SCHWEFELSÄURE.

*Versuch I.* Eine grosse Menge von menschlichen Spulwürmern bekam ich freundlicher Weise von einem Direktor einer Volksschule, wo mit den sämtlichen Schülern aus Gründen der Gesundheitspflege eine Askariskur angestellt wurde. 600 g des Materials, die im gerockneten Zustande 60 g entsprechen, wurden mit der Schere zerkleinert, mit Schwefelsäure versetzt und 14 Stunden lang auf freier Flamme am Rückflusskühler gekocht. Die Flüssigkeit wurde mit Baryt bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Der Niederschlag wurde abgesaugt. Das Filtrat wurde mit Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit und auf ein kleines Volumen eingeeengt. Nach starkem Ansäuern mit Schwefelsäure, deren Prozentgehalt 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  betrug, wurde die Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde weiter nach Kossel und Kutscher bearbeitet, um Purin- und Hexonbasen zu isolieren. Das Filtrat diente zur Gewinnung von Tyrosin und Leucin.

Aus der Purinbasenfraktion gewann ich eine Substanz, welche in Silbersalz verwandelt wurde. Das Salz wurde nach Kjeldahl verbrannt. Der gesamte Stickstoff betrug 0,0166 g.

Aus der Histidinfraktion wurden 0,0194 g als Pikrolonat isoliert. Das Pikrolonat wurde in Histidindichlorid übergeführt, das bei 250°C schmolz.

Aus der Argininfraktion bekam ich 2,1739 g Substanz als Pikrat, welche bei 205°C schmolz.

0,1103 g Substanz lieferte 0,1455 g  $\text{CO}_2$  und 0,0423 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Argininpikrat:  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$

Ber. C: 35,73% H: 4,21%

Gef. C: 35,97 „ H: 4,29 „

Aus der Lysinfraktion wurden 4,0162 g Pikrat einer Base gewonnen. Der Schmelzpunkt der Substanz war nicht zu konstatieren.

Analyse des Pikrates.

0,1194 g Substanz gaben 0,1686 g  $\text{CO}_2$  und 0,0492 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Lysinpikrat:  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$

Ber. C: 38,40% H: 4,53%

Gef. C: 35,51 „ H: 4,61 „

Das vom Phosphorwolframat getrennte Filtrat wurde mit Baryt versetzt und abfiltriert. Das Filtrat wurde von Baryt befreit und auf dem Wasserbade eingedampft. Dabei schied sich zuerst das Tyrosin und dann das Leucin aus.

*Versuch II.* 600 g Askaris wurden durch Schwefelsäure hydrolisiert. Diesmal bekam ich 0,0161 g N aus der Purinbasenfraktion, 1,4518 g Dipikrolonat aus der Histidinfraktion, 1,3754 g Argininpikrat und 3,9372 g Lysinpikrat.

Analyse des Argininpikrates.

0,1150 g Substanz gaben 0,1515 g  $\text{CO}_2$  und 0,04470 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Ber. f.  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$

Ber. C: 35,73% H: 4,21%

Gef. C: 35,92 „ H: 4,35 „

Analyse des Lysinpikrates.

0,1102 g Substanz gaben 0,1546 g  $\text{CO}_2$  und 0,0453 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Lysinpikrat:  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$

Ber. C: 38,40% H: 4,53%

Gef. C: 38,26 „ H: 4,59 „

Das Tyrosin in den beiden Versuchen wog zusammen 1,2577 g.

0,1050 g Substanz brauchten 5,7 ccm n/10- $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Ber. f.  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$

Ber. 7,73% N

Gef. 7,60 „ „

Das Leucin wog dabei zusammen 9,3265 g.

0,080 g Substanz brauchten 6,1 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ber. f. C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>

Ber. 10,69%N

Gef. 10,67 „ „

Die Gesamtmenge der isolierten Substanzen ist prozentual gegen das trockne Ausgangsmaterial in folgender Tabelle zusammengestellt.

	I	II
	(%)	(%)
Purinbasen-N .....	0,030 .....	0,03
Histidin .....	0,001 .....	0,89
Arginin .....	1,560 .....	0,99
Lysin .....	2,610 .....	2,55
Tyrosin .....	2,09	
Leucin .....	15,54	

## II. HYDROLYSE DER SPULWÜRMER DURCH SALZSÄURE.

*Versuch III.* 600 g Spulwürmer wurden klein zerschnitten, mit konz. Salzsäure auf freier Flamme am Rückflusskühler 6 Stunden lang hydrolisiert dann durch ein Koliertuch abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Tierkohle aufgeköcht, filtriert, unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingeeengt, und in der Kälte mit gasförmiger Salzsäure gesättigt, und einige Tage im Eisschrank stehen gelassen. Dabei schied sich das Chlorhydrat der Glutaminsäure aus. Die Gesamtmenge der gewonnenen Substanz wog 2,8748 g.

0,1232 g Substanz verbrauchten 6,6 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ber. f. C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub> · HCl: 7,64%N

Gef. 7,50 „ „

Das Filtrat der Glutaminsäure wurde unter vermindertem Druck zu dickem Sirup eingedampft und nach der Regel 3 Mal verestert, wobei sich von dem Esterchlorhydrat ganz wenig

Krystalle ausschieden. Die gesamte Flüssigkeit wurde zu dickem Sirup eingeengt, und dann genau nach Angabe von E. Fischer bearbeitet um die Aminosäureester zu fraktionieren. Die Fraktionen ergaben folgendes Bild:

	Gewicht (g)	Temp. (des Wasser-u. Oelbades)	Druck (mm)
1. Fraktion .....	1,3 .....	60°C .....	12
2. „ .....	3,3 .....	100° „ .....	12
3. „ .....	4,6 .....	100° „ .....	0,5
4. „ .....	3,0 .....	170° „ .....	0,5

Die erste Fraktion wurde noch einmal in Esterchlorhydrat umgewandelt, wobei sich das Glykokollesterchlorhydrat krystallinisch sehr leicht ausschied. Es betrug 0,3216 g.

0,1214 g Substanz verbrauchten 8,6 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ber. f. C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>·HCl: 10,03%N

Gef. 9,91 „ „

Das Filtrat wurde wieder nach E. Fischer zum Ester bearbeitet. Aus der 2. u. 3. Fraktion wurde das Prolin in siedenden absoluten Alkohol genommen, gereinigt und dann in Kupfersalz umbewandelt. Das Salz wog 2,6132 g.

0,1714 g Substanz gaben 0,0462 g CuO.

Ber. f. (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> Cu: 21,79%

Gef. 21,52 „ „

Der in Alkohol unlösliche Teil der Aminosäuren wurde in Kupfersalz verwandelt. Es wurde dann mit konz. Methylalkohol erschöpfend extrahiert. Aus dem in Methylalkohol unlöslichen Teil wurden 1,1858 g Alanin-, 2,7648 g Leucinkupfer getrennt gewonnen.

Analyse des Alaninkupfers.

0,1200 g Substanz gaben 0,0397 g CuO.

Ber. f. (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> Cu: 26,52%

Gef. 26,33 „ „

## Analyse des Leucinkupfers.

0,0992 g Substanz gaben 0,0242 g CuO.

Ber. f. $(C_6H_{12}NO_2)_2 Cu$ :	19,63%
Gef.	19,54 „

Der in Methylalkohol lösliche Teil wurde nach Racemisierung wieder in die Kupfersalze verwandelt. Mittels Alkohol wurde Valinkupfersalz von Isoleucinkupfersalz getrennt gewonnen. Das Valinkupfer wog 0,6112 g.

0,0728 g Substanz gaben 0,0196 g CuO.

Ber. f. $(C_5H_{10}NO_2)_2 Cu$ :	21,49%
Gef.	21,42 „

Das Isoleucinkupfer wog 1,0856 g.

0,0494 g Substanz gaben 0,0121 g CuO.

Ber. f. $(C_6H_{12}NO_2)_2 Cu$ :	19,64%
Gef.	19,55 „

Aus dem ätherlöslichen Teil der 4. Fraktion wurde salzsaures Phenylalanin gewonnen, das 0,0160 g wog.

0,0160 g Substanz brauchten 0,7 ccm n/10- $H_2SO_4$ .

Ber. f. $C_9H_{11}NO_2 \cdot HCl$ :	6,95% N
Gef.	6,13 „ „

Aus der von Phenylalaninester getrennten wässrigen Lösung wurde die Asparaginsäure in Freiheit gesetzt, welche 0,2671 g wog.

0,1022 g Substanz brauchten 7,5 ccm n/10- $H_2SO_4$ .

Ber. f. $C_4H_7NO_4$ :	10,22% N
Gef.	10,27 „ „

Aus der Mutterlauge der Asparaginsäure bekam ich Serin als  $\beta$ -Naphthalinsulfosalz (1,2166 g).

0,1306 g Substanz brauchten 4,1 ccm n/10- $H_2SO_4$ .

Ber. f. $C_{13}H_{13}O_5NS$ :	4,74% N
Gef.	4,39 „ „

Die Gesamtmenge der Aminosäuren, welche durch Hydrolyse mit Salzsäure isoliert wurden, ist in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle III.

Leucin .....	3,70%
Alanin .....	1,45 „
Valin .....	0,79 „
Prolin .....	3,41 „
Isoleucin .....	1,45 „
Serin .....	0,72 „
Glutaminsäure .....	3,93 „
Asparaginsäure .....	0,36 „
Glykokoll .....	0,29 „
Phenylalanin .....	0,02 „

## AUTOLYSE DER SPULWÜRMER.

*Versuch IV.* 500 g Askaris wurden mit der Schere sehr klein zerschnitten, in der Reibschale mit gereinigtem Sand energisch zerrieben. Die Gesamtmasse wurde mit Chloroformwasser (3 L.) gemischt, kräftig geschüttelt, mit einer geringen Menge von Toluol überschichtet. Das Gemisch wurde unter täglich einmaligem Umschütteln 20 Tage lang im Brutschrank bei 37°C stehen gelassen. Nach der Digestion reagierte das Gemisch stark alkalisch. Nach Konstatierung der bakteriologischen Reinheit wurde das Gemisch durch ein Tuch koliert. Das Kolat wurde mit Essigsäure angesäuert, im siedenden Wasserbade 2 Stunden erhitzt, und dann filtriert. Das klare Filtrat wurde nach starkem Ansäuern mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag abfiltriert. Im Filtrat konnte ich Tyrosin und Leucin nicht nachweisen. Der Niederschlag wurde nach Kossel und Kutscher bearbeitet, um die Hexonbasen zu isolieren. Purinbasen-N betrug im ganzen 0,0230 g. In der Histidinfraktion bekam ich 0,0230 g Substanz als Pikrolonat.

Die Identifizierung war nicht möglich. Aber in der Lysinfraktion wurde 0,9050 g Substanz als Pikrat gewonnen.

0,1154 g Substanz lieferte 0,0420 g  $H_2O$  und 0,1570 g  $CO_2$ .

Zusammensetzung. C: 37,10%    H: 4,07%.

Daraus kann man schliessen, dass diese Substanz weder Lysin noch Betain, sondern eine andere, von unbekannter Natur ist.

Ausserdem bekam ich aus der Lysinfraktion Cholin und eine andere Substanz in ganz geringer Menge, welche die Millonsche Reaktion zeigte.

Zum Schluss fühle ich mich verpflichtet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. M. Tsudji und Herrn Dozent Dr. Y. Sendju meinen herzlichen Dank für ihre überaus freundliche Anleitung auszusprechen.

#### LITERATUR.

Flury, F. (1912): Arch. f. exp. Path. und Pharm., **67**, 275.

Yoshimura, S. und Urashima, S. (1930): Nagasaki Igakkai Zassi, **8**, Heft 1.

## STUDIEN ÜBER DAS EPITHELKÖRPERCHEN- HORMON UND DEN KALKSTOFFWECHSEL.

VON

MICHIAKI INABA.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Kenritsu-Hospitals zu Kobe.  
Vorstand: Dr. M. Takeda.)

(Eingegangen am 17. März 1930.)

In den letzten Jahren erschien eine Reihe interessanter biochemischer Arbeiten über die parathyreoprive Tetanie.

MacCallum u. Voegtlin (1910), Neurath (1911), Hasting u. Murry (1921), Salvesen (1923), und Trendelenburg (1923) bewiesen, dass nach der Entfernung der Nebenschilddrüsen sich eine starke Hypocalcämie einstellt. Parhon u. Ureche (1913), MacCallum u. Voegtlin (1921), und andere Autoren sahen eine auffallende Besserung der Tetaniesymptome der parathyreoidectomierten Tiere nach Ca-Zufuhr. Diese Beobachtungen bestätigten Berkeley u. Beede (1909), Bell u. Martin (1913), Biedl (1913), Findley (1916), Farner u. Klinger (1920) und Salvesen (1923).

Die meisten dieser Untersuchungen, die sich mit der Aufklärung über die Beziehung zwischen Ca-Stoffwechsel und Nebenschilddrüsenfunktion im Organismus beschäftigen, klären aber noch nicht den Mechanismus der Kalkstoffwechselstörung bei Parathyreoidectomie auf.

Wichtige Factoren, welche eine Verminderung der Ca-Ionen im Blutserum veranlassen, sind folgende:

1. Veränderung des Dissoziationszustandes des Blutcalciums.
2. Vermehrte Ca-Deponierung in den Geweben.
3. Behinderung der Ca-Mobilisation vom Gewebe ins Blut.
4. Vermehrung der Exkretion (hauptsächlich) im Harn und im Kot.

Es wird von grossem Interesse sein, festzustellen, welcher Faktor unter den oben angegebenen am wichtigsten ist für das Zustandekommen der Hypocalcämie bei der parathyreopriven Tetanie.

Wirksame Extrakte aus den Epithelkörperchen die fähig sind, die Calcium-Konzentration im Blute zu steigern, wurden zuerst von Collip u. Clark (1925) gewonnen. Nach diesen Autoren enthalten diese Auszüge getrocknet 14,5% Stickstoff, daneben wenig Eisen und Schwefel.

Collips Ergebnisse haben weitgehende Bestätigung gefunden in den Arbeiten von Berman (1923), Greenwald (1924), Davidson (1925), Lisser u. Shepardson (1926), Moritz u. Looney (1925). Auch wir haben auf diese Weise ein Präparat hergestellt, welches den Calciumspiegel im Blut nach unserem Willen steigern kann.

Greenwald (1926) hat mit dem von Collip dargestellten Extrakt beim Hunde die Hypercalcämie im Serum und eine Vermehrung der Ca-Ausscheidung im Harn und Kot bestätigt. Deswegen vermutete Greenwald, dass diese Auszüge die Calcium-deponierung im Gewebe verhindern, ja sogar die vermehrte Mobilisation des Calciums ins Blut bewirken.

Ich habe eine Reihe von Versuchen ausgeführt, die die für den Mechanismus der Kalkstoffwechselstörung bei Parathyreoidektomie nicht unwichtige Frage entscheiden sollten, ob Greenwalds Annahme richtig ist, oder ob sich noch andere Erklärungen dafür auffinden lassen.

#### VERSUCHSMETHODE.

Versuchstiere waren Kaninchen. Das zur Bestimmung des Serumkalkes und Phosphates notwendige Blut habe ich aus den Ohrvenen tropfenweise in Mengen bis 5 ccm entnommen. Die Calciumbestimmung im Blutserum wurde nach Kramer und Tisdall (1921) ausgeführt.

Zur Bestimmung des anorg. Phosphates im Blut habe ich nach

Kramer und Tisdall enteiusst, und die kolorimetrische Methode nach Bell und Doisy (1920) benutzt.

Die Tiere müssen vor den Versuchen kontrolliert werden, ob sie nicht an Eiterungen, Dermatitis oder Pneumonie leiden, oder gravid sind.

Solche Faktoren wirken sofort auf den Ca- und Phosphatstoffwechsel, wie wir tatsächlich oft beobachteten. Besonders muss man sich hüten die Tiere aufzuregen. Von Epithelkörperchenpräparaten bediente ich mich des Parathyrenin.

Da der Blutcalciumgehalt auch durch verschiedene Momente, wie Hunger, Erregung u.s.w. beeinflusst wird, so befand sich jedes Versuchstier während der ganzen Versuchszeit in bestimmtem isoliertem Käfig, und wurde mit Okara um 5 Uhr nachmittags gefüttert.

#### VERSUCHSERGEBNISSE.

##### I. Physiologischer Blutkalkspiegel des Kaninchens.

Der Serumkalkgehalt des Menschen ist durch umfassende Untersuchungen einer Anzahl von Forschern wie Jansen (1923), Leicher (1923), Billigheimer (1922), Kylin u. Silversvärd (1923), Brinkman (1915), Yoshimura (1920), Kitayama (1927), u.a. mit fast übereinstimmenden Ergebnissen klar gestellt worden. Über die Verhältnisse bei Kaninchen liegt nicht soviel vor.

Kusa (1925) untersuchte die Blutkalkmenge bei 15 Kaninchen und fand 14,70 mg% bis 12,40 mg%, durchschnittlich 13,41 mg%.

Nach Graut und Gates (1925) ist der Blutealziumgehalt bei Kaninchen von der Jahreszeit abhängig, nämlich im Januar und September etwas niedriger, durchschnittlich 11,74 mg%, dagegen im Mai und November etwas erhöht, durchschnittlich 12,90 mg%.

Um den physiologischen Blutkalkspiegel eingehend klarzulegen, habe ich bei Kaninchen die Jahreszeitvariationen und die täglichen Verschiebungen des Serumkalkes verfolgt.

*A. Jahreszeitveränderungen des Blutkalkgehaltes bei Kaninchen.*

Um die Jahreszeitverschiebungen des Serumkalkgehaltes klarzustellen, habe ich bei 1,500 bis 2,900 Kg Körpergewicht fast das ganze Jahr hindurch den Serumkalkgehalt untersucht und die in der Tabelle angegebenen Resultate gefunden.

TABELLE I.

Jahreszeit (1928)	Nummer d. Tiere	Blutkalkgehalt		
		Maximum mg%	Minimum mg%	Durchsch. Wert. mg%
8/III bis 20/III	12	14,50	13,05	13,92
10/IV bis 24/IV	6	14,60	13,10	14,06
23/VII bis 30/VII	6	13,53	11,23	11,86
2/VIII bis 26/VIII	8	13,20	12,10	12,49
3/IX bis 25/IX	12	14,52	11,80	13,31
1/X bis 28/X	13	14,20	12,20	12,28
16/XI bis 28/XI	8	14,30	12,40	13,32
12/XII bis 25/XII	9	14,50	13,10	13,54
21/II bis 27/II (1929)	7	14,60	13,50	14,10
81 Kaninchen				13,26

*B. Tägliche Schwankungen des Serumkalkspiegels bei Kaninchen in einem gewissen Zeitablauf.*

Um die täglichen Schwankungen des Serumkalkgehaltes zu ermitteln, habe ich an mehreren auf einander folgenden Tagen täglich an demselben Tier eine Serumkalkbestimmung ausgeführt; die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Aus diesen Studien über das Verhalten des Serumkalkspiegels zu den verschiedenen Jahres- und Tageszeiten erkennen wir den Grad der physiologischen Serumkalkvariationen.

Kaninchen Nr.	23/VIII mg%	24/VII mg%	25/VII mg%	28/VII mg%	29/VII mg%
16	12,03	11,25	13,52	11,53	
17	11,43	11,53	12,60	12,30	
18	11,75	11,02	11,63	12,13	12,63
19	12,25	11,83	13,03	12,60	12,40

## II. Einfluss der Blutentnahme.

Um den Blutkalkspiegel eingehend und systematisch zu untersuchen, ist es nötig häufig mit kurzem Zeitintervall das Blut zu entnehmen und den Kalkgehalt zu bestimmen. Nakayama (1922) hat eine Hypocalcämie nach wiederholten Blutentnahmen gefunden. Clark (1920) hat eine Blutkalkabnahme nach grossem Blutverlust bei Kaninchen festgestellt. Okumura (1920) fand bei gesunden Kaninchen auch eine Verminderung des Blutealciumgehaltes nach mehrmaliger Blutentnahme von 4 bis 5 ccm. Swingle und Weiner (1926) dagegen beobachteten beim Hunde eine Vermehrung des Blutealciumgehaltes, und Stewart u. Percival (1927) ebenfalls bei der Katze.

Darum stellte ich Versuche über den Einfluss häufiger Blutentnahmen auf den Blutkalkgehalt an normalen Kaninchen an.

Die Resultate meiner Untersuchungen, welche in Tabelle II und in Abbildung 1 angegeben sind, sind folgende: Einmalige Blutentnahme von 4 bis 5 ccm bedingt keine Veränderung, dieselbe 3 bis 4 mal innerhalb eines Tages wiederholt auch nur eine sehr geringe, bei noch häufigerer Blutentnahme (über 5 mal) zeigt sich eine Verminderung des Serumkalkspiegels.

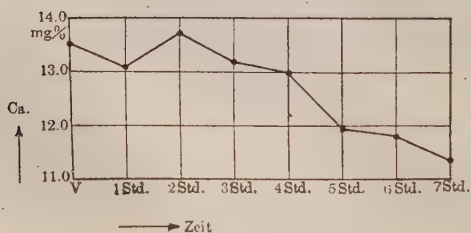
## III. Zufuhr von Epithelkörperchenpräparat.

Collip und Greenwald beobachteten und glaubten, dass die Epithelkörperchenpräparate keine Wirkung auf den Blutkalkspiegel beim Kaninchen ausüben.

TABELLE II.

Nummer d. Tiere	Zeitverlauf							
	Vor mg%	1 Std. mg%	2 Std. mg%	3 Std. mg%	4 Std. mg%	5 Std. mg%	6 Std. mg%	7 Std. mg%
1	13,45		13,20	12,15	12,30		11,80	11,10
2	14,10	13,65	13,20	13,80	11,50	11,25		
3	13,40		13,60	13,10	13,20		12,25	
4	12,80	12,60		12,20		11,20	11,10	11,80
5	14,30		14,50	14,30	13,35	12,80		
6	14,00	13,60		13,55	13,40		12,30	
7	13,80		13,65	13,10	12,85		11,50	
8	12,65	12,50	12,80	12,10		11,85		11,20
9	13,15	13,30		13,10	13,20		12,15	
10	13,45		13,55	13,20	13,30	12,75	11,10	11,35

Abb. 1. Einfluss der Blutentnahme.



Nach Greenwald und Gross (1925) ist die Katze gegen das Epithelkörperchenpräparat resistenter, der Hund recht empfindlich. Hoffman, Burt, und Robinson (1926) haben am Kalb Versuche angestellt.

Herxheimer (1927) verfolgte systematisch die Wirkung des Epithelkörperchenhormons und die von Kalkinjektion auf den Blutkalkspiegel beim Hund und bei der Katze, sowie beim Kaninchen, und stellte fest, dass das Epithelkörperchenhormon bei den verschiedenen Tierarten im gleichen Sinne wirkt, und zwar eine

Erhöhung des Blutkalkgehaltes bedingt, die nur zeitlich verschieden ist.

*A. Innerliche Zufuhr von Epithelkörperchenpräparat.*

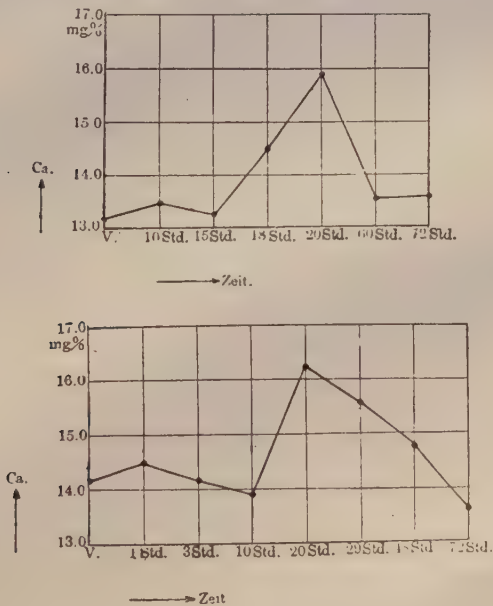
Parathyrenin wurde mit einem Gummikatheter eingeführt. Danach habe ich Blut mit mässigem Zeitintervall entnommen und den Kalkgehalt des Serums untersucht; aber niemals habe ich innerhalb von 4 Tagen eine deutliche Veränderung des Kalkgehaltes im Blutserum gefunden.

*B. Versuche mit subcutaner Injektion von Parathyrenin.*

Greenwald und Gross (1925), Collip (1925), auch Hansen (1923), haben nachgewiesen, dass subcutane Injektion

Abb. 2: Subeutane Injektion von Parathyrenin.

- 1) Kaninchen 2,580 Kg Parathyrenin 1,0 cem pro Kg sube.
- 2) Kaninchen 2,540 Kg Parathyrenin 0,8 cem pro Kg sube.



von Parathyrenin bei normalen Tieren (Kaninchen) keine nennenswerte Vermehrung des Kalkgehaltes herbeiführt; und sie haben das der kurzdauernden Wirkung von Parathyrenin zugeschrieben, wie es bei Adrenalin u. Pilocarpin der Fall ist.

Das kann aber, wie Greenwald und andere Autoren bewiesen haben, auch als Folge des Blutverlustes durch häufige Blutentnahmen angesehen werden.

Zur Entscheidung dieser Frage habe ich weitere Versuche angestellt, wobei mit ziemlich langem Zeitintervall das Blut entnommen wurde nach voraufgegangener subcutaner Parathyrenininjektion. Immer fand ich Hypercalcämie, wie aus der Abb. 2 ersichtlich ist.

#### *C. Versuche mit Parathyrenin bei intravenöser Injektion.*

Um den Einfluss des intravenös injizierten Parathyrenins auf den Kalkgehalt im Blutserum zu beobachten, habe ich Parathyrenin 0,4 ccm bis 0,1 ccm pro Kg eingespritzt. Die Resultate stellte ich in den nachstehenden Abb. 3–5 zusammen.

Wie aus diesen Abb. ersichtlich ist, tritt nach intravenöser Einspritzung von Parathyrenin eine ziemlich deutliche Hypercalcämie ein, die bei Einspritzung von 0,2 bis 0,3 ccm Parathyrenin pro Kg am intensivsten ist und zwischen der 10. bis 20 Stunde den Höhepunkt erreicht.

Die Zunahme des Serumkalkes nach intravenöser Einspritzung von Parathyrenin beträgt in manchen Fällen 31 bis 38% (4,0–5,5 mg%). Sie beginnt aber nach 24 Stunden sich wieder zu sinken, um nah 48 Stunden den Ausgangswert zu erreichen.

#### **IV. Versuche mit Parathyrenin zusammen mit Chlorealcium-Lösung bei intravenöser Injektion.**

Gesehen haben wir schon, dass die Einspritzung von Parathyrenin (besonders intravenöse Injektion) einen erhöhten Blutkalkgehalt bedingt.

Abb 3.

Blutserumkalkgehalt nach intravenöser  
Injektion von Parathyrenin.  
Parathyrenindosis:

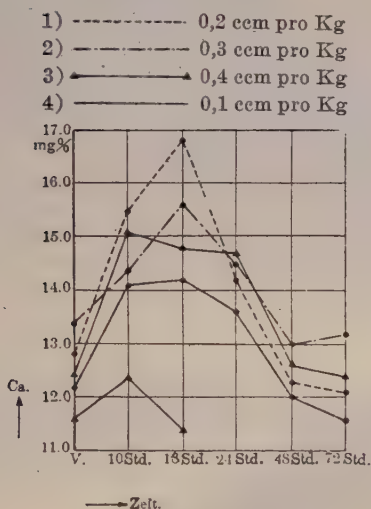


Abb 4.

Blutserumkalkgehalt nach  
intravenöser Injektion  
von Parathyrenin.

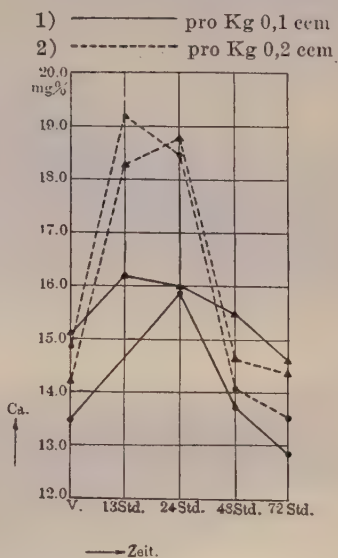
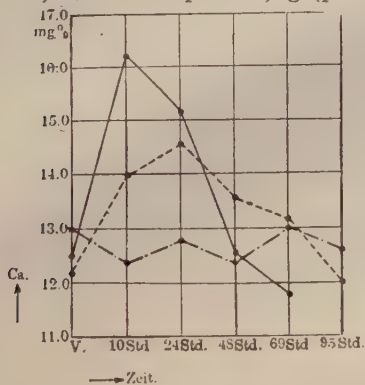


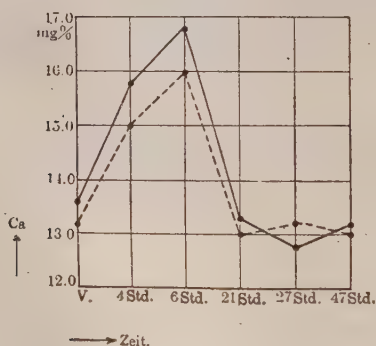
Abb 5. Blutcalciumgehalt nach Parathyreningabe.

- 1) ——— intravenös 0,2 cem (pro Kg)  
2) ----- subcutan 0,2 cem (pro Kg)  
3) ——— per os 0,2 g (pro Kg)



Zunächst wurden nun weitere Versuche so angestellt, dass Kaninchen, denen vorher Chlorcalcium eingespritzt wurde und die dadurch hypercalcämiert waren, Parathyrenin injiziert wurde. Und dann wurde um den Einfluss von Parathyrenin auf Hypercalcämie durch Chloreocalciuminjektion klar zu stellen, gleichzeitig mit der intravenösen Einspritzung von Chloreocalcium wurde parathyrenin introvenös injiziert. Die Blutealcium-Kurve habe ich genau verfolgt.

Abb. 6.  
Blutserumkalk nach  $\text{CaCl}_2$ -Lösung  
1% 10 ccm pro Kg, intravenöse  
Injektion.



Diese Blutealcium-Kurven nach gleichzeitiger Einspritzung von Parathyrenin und Calcium Chlorid (Abb 7 u. 8) wurden mit den Kurven verglichen, bei denen Parathyrenin oder Chloreocalcium allein injiziert worden war (Abb. 6). Der Vergleich ergab bei der gleichzeitigen Injektion von beiden eine typische Blutkalk-Kurve mit einer 140–166 Stunden dauernden Hypercalcämie, während bei der Injektion eines Mittels eine nur 48 Stunden anhaltende Hypercalcämie festzustellen war.

Abb. 7. Körpergewicht 2,850 Kg.

Versuche mit Parathyrenin zusammen mit Chlorecalcium  
Lösung, intravenöse Injektion.

- 1)-----Blutserumkalk bei Ca  $CL_2$ -Lösung-Injektion.
- 2)-----Blutserumkalk bei Parathyrenininjektion.
- 3)———Blutkalk bei Parathyrenin + Ca  $CL_2$ -Lösung.

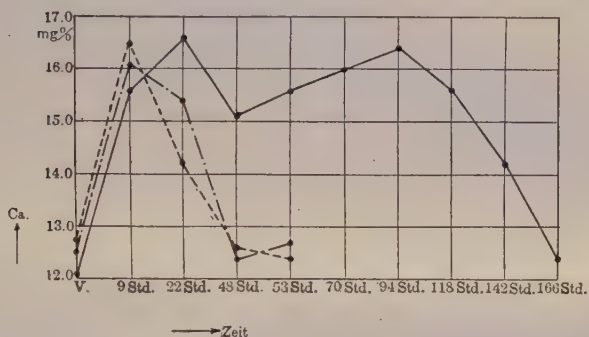
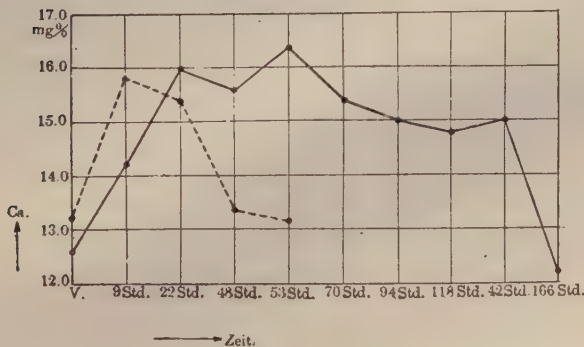


Abb. 8. Körpergewicht 2,650 Kg.

Versuche mit Parathyrenin zusammen mit Chlorecalcium  
Lösung, intravenöse Injektion.

- 1)-----Blutserumkalk bei Ca  $CL_2$ -Lösung Injektion.
- 2)-----Blutkalk bei Parathyrenin + Ca  $CL_2$ -Lösung Injektion.



## V. Einfluss der intravenösen Injektion von Parathyrenin auf den Phosphatgehalt im Blutserum.

Ich habe schon die Wirkung des Epithelkörperchenhormons (Parathyrenin) auf den Kalkstoffwechsel bei Kaninchen untersucht und 12–24 Stunden nach der intravenösen Einspritzung regelmässig eine Blutkalkspiegelerhöhung gefunden.

Da Ca und Phosphat-Stoffwechsel immer eng miteinander zusammenhängen, siehe z. B. Tetanie oder Rachitis, war es von Interesse nachzuprüfen, ob nach Parathyrenin-Injektion der Phosphatspiegel im Blut von Kaninchen verändert wird.

Greenwald konnte feststellen, dass bei parathyreopriven Hunden der Quotient P/N im Harn stark abnimmt, während im Stuhl eine entsprechende Zunahme der Phosphorausscheidung nicht zu konstatieren war. Er nimmt an, dass bei der Tetanie eine Phosphor-Speicherung in den Geweben zu erwarten ist. Poper (1926) hat zur Frage der Phosphorretention in den Organen an parathyreopriven Katzen experimentell gearbeitet, aber er hat entgegen der Annahme von Greenwald den P-Gehalt der Organe nicht wesentlich verändert gefunden.

Ergebnisse über den Einfluss des Nebenschilddrüsenhormons auf den Phosphatspiegel im Blute wurden von mehreren Autoren mitgeteilt.

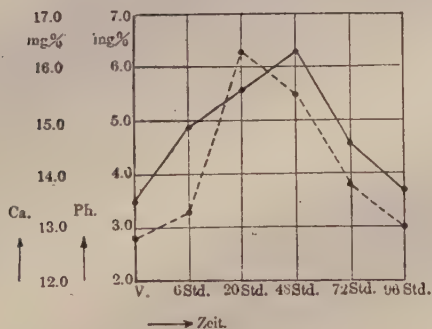
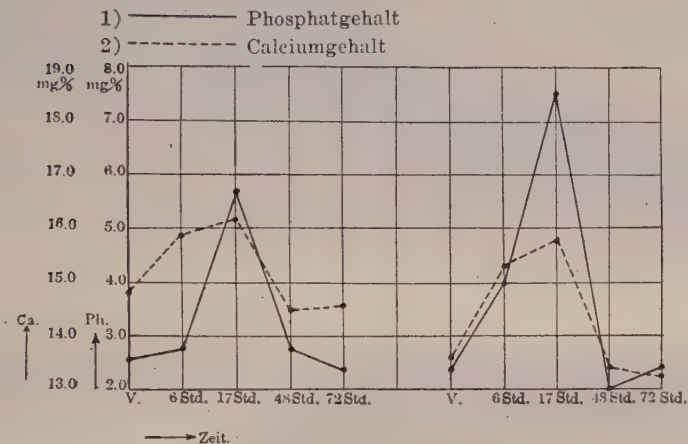
Collip, Clark und Scott (1926) haben Blutphosphatspiegelerhöhungen gesehen, bei den Bingerschen Untersuchungen (1918) aber blieb der Phosphatspiegel im Blut unbeeinflusst.

Ich habe deshalb die Wirkung von Parathyrenin auf den Phosphatspiegel des Blutes bei Kaninchen zeitlich verfolgt und zwar mit gleichzeitiger Bestimmung des Blutkalkgehaltes.

Bei diesem Versuch sieht man nach der Injektion von Parathyrenin (0,1–0,2 ccm pro Kg) ein mässiges Ansteigen des Blutphosphatspiegels.

Die Kurven der Ca- und Phosphat-Vermehrung verlaufen zeitlich fast parallel. (Abb. 9).

Abb. 9. Phosphat- und Calciumgehalt im Blutserum nach Parathyrenin-Injektion.



## VI. Einfluss des vegetativen Nervensystems u. der Inkrete auf den Blut-Ca-Phosphatspiegel.

Die Annahme, dass die vegetativen Nerven auf dem Wege über das Elektrolytsystem wirken, ist inzwischen von einer Reihe von Autoren bestätigt worden.

Andererseits weisen die klinischen Symptome verschiedener Erkrankungen und die experimentellen Tatsachen mit grösster Wahrscheinlichkeit auf eine innige Beziehung zwischen den Drüsen mit innerer Sekretion und dem vegetativen Nervensystem hin.

Den Zusammenhang zwischen dem vegetativen Nervensystem und der Elektrolytwirkung hat zuerst Zondeck (1922) an isolierten Organen nachgewiesen, Weiterhin haben Billigheimer (1922), Dresel und Katz (1922), Wollheim (1924) und andere am Gesamtorganismus untersucht und gefunden, dass sowohl nach Adrenalingabe als auch durch Sympathicusreizung bei allen Organen eine Zunahme des Kalkgehaltes erzielt wird, während der Kalkspiegel des Blutes sinkt. Vagusreizung führt dagegen zu einer Kaliumanreicherung in den Organen. Hier drängt sich die Vermutung auf, dass unter dem vegetativen Nervensystem, den Inkreten und dem Elektrolytsystem eine enge Korrelation bestehen müsse.

Die Hypercalcämie nach Parathyrenin-Injektion und ihre Verlängerung nach gleichzeitiger Injektion von  $\text{CaCl}_2$ -Lösung können entweder durch eine verminderte Ausscheidung des Calciums aus dem Körper oder durch eine herabgesetzte Kalkdeponierung im Gewebe bedingt sein. Es sind aber auch noch andere Faktoren denkbar, so z. B. der Einfluss anderer endocriner Organe oder des vegetativen Nervensystems. So richteten sich meine Untersuchungen nach den letztgenannten Punkten d.h. auf den Einfluss endocriner Organe und des vegetativen Nervensystems.

Unter den verschiedenen Inkreten und vegetativen Nervengiften habe ich mit Adrenalin, Insulin, Pilocarpin, Atropin und Pituglandol gearbeitet und die folgenden Ergebnisse erhalten:

Subcutane Injektion von 0,1% Pilocarpin, 0,1–1 ccm pro Kg. veranlasst eine Ca- und Phosphat-Verminderung im Blut; die Hypoglykämie nach Insulininjektion hat keinen Einfluss auf den Blut-Calziumgehalt; nach 0,5 ccm einer 0,1% Adrenalin-Lösung subcut. tritt eine Verminderung des Blut-Calciumgehaltes ein; 0,1% Atropinsulfat Lösung 0,3 ccm pro Kg. vermindert den Ca-

Abb 10.

Einfluss des Vegetativen  
Nervensystems und der Inkrete  
auf das Blutcalcium.

Atropin

- 1) ——— Atropin 1‰ 0.1 cem subcut. (pro Kg)  
2) - - - - -  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  1% 10 cem intravenös (pro Kg)  
3) ——— Atropin mit  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  Lösung.

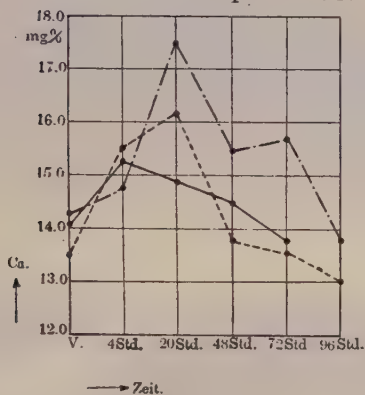
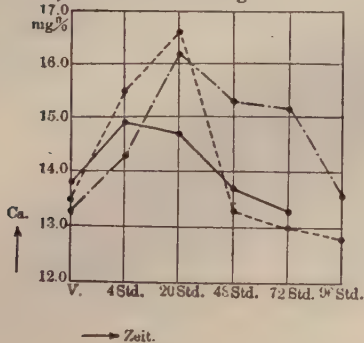


Abb. 11.

Pituglandol (10 fach verdünnt).

- 1) ——— Pituglandol 0.2 cem pro Kg subcut.  
2) - - - - -  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  1% 10 cem pro Kg intravenös.  
3) ——— Pituglandol mit  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  Lösung.



und Phosphat-Gehalt; 0,1 ccm pro Kg. vermehrt den Ca. und Phosphat-Gehalt, 0,2 ccm pro Kg vermehrt ihn ziemlich deutlich: Pituglandol (10 fach verdünnt mit physiol. Kochsalz-Lösung) 0,2 oder 0,3 ccm pro Kg subcutan vermehrt den Ca- und Phosphat-Gehalt bedeutend, aber Atropin oder Pituglandol kombiniert mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung verlängern die Hypercalcämie nur wenig, und nicht so bedeutend wie Parathyrenin (Siehe Abb. 10 u. 11).

#### VII. Ausscheidungsversuch bei intravenös eingeführtem Ca und Parathyrenin.

Ich möchte noch einmal die Aufmerksamkeit auf den Versuch Greenwald's lenken, welcher zeigt, dass nach Verabreichung des Epithelkörperchenhormons der Blutkalkgehalt deutlich zunimmt, und im Harn u. Kot die Ca-Ausscheidung steigt. Daraus zog Greenwald den Schluss, dass die durch Epithelkörperchenhormoninjektion hervorgerufene Hypercalcämie nicht durch Hemmung der Ca-Ausscheidung, sondern durch Verminderung der Ca-Deponierung in den Geweben herbeigeführt wurde.

Es bleibt aber noch die Frage offen, ob die nach Injektion von Chlorealcium zusammen mit Parathyrenin beobachtete abnorm langdauernde Hypercalcämie auch durch die Hemmung der Ca-Ausscheidung verursacht wird oder nicht.

Zu diesem Zwecke habe ich zuerst 4–5 Tage lang im Harn und Kot das Ca analytisch quantitativ bestimmt, und am letzten Tage einerseits Calciumchlorid oder Parathyrenin allein, andererseits Chlorealcium zusammen mit Parathyrenin intravenös injiziert; an den folgenden 4–10 Tagen wurde das Calcium im Harn und Kot weiter bestimmt.

Während dieses Versuches wurden die Versuchskaninchen in dem Stoffwechselkäfig gehalten, bekamen als Futter Okara, 200 g, dessen Ca-Gehalt 30–40 mg vorher festgestellt worden war.

Der tägliche Harn wurde immer mittels Gummikatheter entnommen; die Ca-Bestimmung im Harn wurde nach der Methode von Sohl u. Pedley (1922) ausgeführt.

Die Kotanalysen wurden so ausgeführt, dass der in je 2 Tagen gesammelte Kot auf einem Wasserbad bis zum Trocknen abgedampft, gepulvert, und genau gewogen wurde; 3,0 g davon wurden im Tiegel verbrannt, und der Ca-Gehalt in der Asche wurde nach der Methode von Sohl u. Pedley bestimmt.

TABELLE III. Körpergewicht 2,200 Kg.

Datum	Menge (cem)	Harn		Kot	
		sp. Gew.	ges. Ca. (mg)	Gewicht (g)	ges. Ca. (mg)
10/VII	140	21	14,60	6,0	} 20,30
11/VII	90	25	16,50	5,0	
12/VII	108	22	13,00	6,0	} 13,15
13/VII	120	26	11,70	7,5	
14/VII	75	23	16,28	10,5	} 20,50
15/VII	100	22	14,00	8,5	

um 1 Uhr p.m. Parathyrenin 0,2 cem pro Kg intravenöse Injektion

16/VII	130	23	51,10	7,0	} 63,45
17/VII	140	26	32,90	1,0	
18/VII	90	27	13,15	15,0	} 81,30
19/VII	100	26	12,20	14,0	
20/VII	95	24	12,54	15,0	} 18,75
21/VII	90	22	13,40	10,0	
22/VII	85	24	14,50	11,0	} 14,25
23/VII	100	23	13,75	14,0	

TABELLE IV. Körpergewicht 2,500 Kg.

Datum	Menge (ccm)	Harn			
		sp. Gew.	ges. Ca. (mg)	Gewicht (g)	ges. Ca. (mg)
10/VII	125	24	13,10	5,5	} 19,10
11/VII	98	26	12,40	8,0	
12/VII	90	23	17,00	7,9	} 20,70
13/VII	120	27	10,80	8,0	
14/VII	115	23	16,28	10,5	} 21,50
15/VII	130	24	13,80	6,5	

um 1 Uhr p.m. Parathyrenin 0,2 ccm pro Kg intravenöse Injektion

16/VII	160	21	48,20	11,0	} 57,80
17/VII	136	26	25,94	7,0	
18/VII	98	24	14,60	9,0	} 48,19
19/VII	120	25	13,20	13,0	
20/VII	100	26	12,30	8,0	} 27,11
21/VII	105	25	13,35	14,3	
22/VII	95	24	10,75	10,0	} 15,50
23/VII	70	21	14,50	9,0	

Aus den Tabellen III-VII geht hervor, dass nach intravenöser Injektion von Parathyrenin in den ersten 2 Tagen die Calciumausscheidung im Harn sowie im Kot deutlich vermehrt ist. Im Harn ist am 3. Tage nach der Parathyrenininjektion die Calciumausscheidung zur Norm zurückgekehrt, während im Kot noch eine vermehrte Calciumausscheidung nachweisbar ist.

TABELLE V. Körpergewicht 2,350 Kg.

Datum	Ca im Blutserum (mg%)	Menge (ccm)	Harn		Kot	
			sp. Gew.	ges. Ca. (mg)	Gewicht (g)	ges. Ca.
4/VIII	12,80	60	31	13,02	8,5	} 31,76
5/VIII	13,10	80	29	16,36	13,0	
6/VIII	13,20	75	31	11,32	4,0	} 27,46
7/VIII	13,30	72	29	15,00	5,0	

um 10 Uhr a.m. 1%Ca CL<sub>2</sub>-Lösung 10 ccm pro Kg intravenöse Injektion

8/VIII	16,95	75	34	24,00	14,0	} 72,00
9/VIII	14,80	68	33	23,40	9,0	
10/VIII	13,40	65	30	15,86	14,1	} 78,28
11/VIII	13,10	52	29	12,20	13,0	
12/VIII	12,10	65	28	14,50	6,0	} 25,48
13/VIII	13,60	70	31	13,75	8,5	

Intravenös injiziertes Calcium verschwindet ziemlich rasch aus dem Blut. Nach intravenöser Darreichung von Calcium zusammen mit Parathyrenin wird deutlich eine länger dauernde Hypercalcämie nachgewiesen, wie es auch im vorangegangenen Abschnitt angegeben wurde. Werden dazu jetzt noch die Zahlen der täglichen Calciumausscheidung berücksichtigt, so ist zu bemerken, dass nach der Injektion von Calcium allein 2 Tage lang im Harn, 4 Tage lang im Kot eine vermehrte Calciumausscheidung zu finden war, während nach der Injektion von Calcium mit Parathyrenin eine fast dem Blutealciumspiegel entsprechende deutliche längerdauernde vermehrte Calciumausscheidung im Harn und besonders im Kot nachgewiesen wurde.

TABELLE VI. Körpergewicht 2,050 Kg.

Datum	Ca. im Blutserum (mg%)	Menge (ccm)	Harn		Gewicht (g)	ges. Ca. (mg)
			sp. Gew.	ges. Ca. (mg)		
27/II	12,07	65	23	10,50	5,0	
28/II	13,60	70	24	13,80	14,0	} 26,64
1/III	11,80	80	25	14,70	9,0	
2/III	13,85	95	22	8,60	7,5	} 15,14
3/III	11,50	75	28	15,72	4,0	

Parathyrenin 0,2 ccm und 1% Chlocalcium Lösg. 10 ccm (pro Kg),  
intravenöse Injektion um 2 Uhr p.m.

4/III	20,10	155	22	82,15	14,0	} 166,71
5/III	19,05	154	21	60,45	17,0	
6/III	17,50	75	22	47,00	16,0	} 212,12
7/III	16,70	74	24	34,80	16,3	
8/III	15,90	65	25	23,05	15,8	} 194,41
9/III	15,50	94	22	23,52	7,5	
10/III	13,50	75	24	15,80	10,5	} 88,36
11/III	13,20	65	23	13,50	8,5	
12/III	13,10	74	22	14,30	9,6	} 42,50
13/III	11,50	85	21	12,58	10,5	
14/III	12,80	90	22	9,95	12,0	} 18,70
15/III	12,50	95	24	10,75	8,6	

TABELLE VII. Körpergewicht 2,400 Kg.

Datum	Ca. im Blutserum (mg%)	Menge (cem)	Harn		ges. Ca. (g)	Gewicht (mg)
			sp. Gew.	ges. Ca. (mg)		
27/II	12,05	90	23	20,50	8,0	23,61
28/II	13,05	95	24	18,70	7,5	
1/III	10,10	105	22	21,50	13,0	
2/III	12,05	160	22	21,60	14,3	18,80
3/III	13,00	120	30	22,60	9,5	

Parathyrenin 0,2 cem pro Kg und 1% Ca CL<sub>2</sub>-Lösung (pro Kg) 10 cem intravenöse Injektion um 2 Uhr p.m.

4/III	22,00	120	20	31,70	26,0	131,17
5/III	20,50	110	22	65,72	12,0	
6/III	19,15	82	23	45,12	9,5	81,50
7/III	17,85	65	26	84,70	17,5	
8/III	16,10	160	22	48,00	16,5	195,00
9/III	14,05	130	25	35,08	8,0	
10/III	12,60	140	21	19,45	8,5	87,28
11/III	13,10	100	22	20,40	9,0	
12/III	12,70	95	23	21,30	10,4	82,35
13/III	13,30	75	22	20,50	12,0	
14/III	12,35	110	23	17,60	14,0	22,10
15/III	12,50	100	23	18,70	9,0	

Aus den oben angeführten Ausscheidungszahlen könnte man beweisen, dass die nach der Injektion von Calcium zusammen mit Parathyrenin beobachtete abnorm lange dauernde Hypercalcämie nicht durch die Hemmung der Calciumausscheidung sondern infolge noch anderer Ursachen, wie Säure-Basen-Gleichgewichtsstörungen im Organismus oder unbekannte abnorme Stoffwechselrichtung, verursacht würde.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Bei subcutaner Verabreichung von Parathyrenin bei Kaninchen (pro Kg 0,8–1,0 ccm) fand ich Hypercalcämie, bei peroraler Gabe aber keine Veränderung des Blutkalkspiegels.

2. Nach intravenöser Einspritzung von Parathyrenin (pro Kg 0,2–0,3 ccm) dauert die Hypercalcämie ungefähr 24 Stunden lang.

3. Nach gleichzeitiger intravenöser Injektion von 1%iger (5 ccm pro Kg)  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und Parathyrenin (pro Kg 0,2 ccm) dauert die Hypercalcämie bedeutend länger (140–166 Stunden), während bei alleiniger intravenöser Injektion von  $\text{CaCl}_2$ -Lösung eine nur 20–28 Stunden lang dauernde Hypercalcämie festgestellt wird.

4. Nach intravenöser Injektion von Parathyrenin tritt eine Vermehrung des Blutphosphatgehaltes ein, wobei die Kurven der Ca- und Phosphat-Vermehrung zeitlich fast parallel sind.

5. Unter den verschiedenen Inkreten und vegetativen Nervengiften z. B. Adrenalin, Insulin, Pilocarpin, Atropin und Pituglandol, vermehren nur Ttropin u. Pituglandol den Blut-Calcium- u. Phosphat-Gehalt.

Atropin oder Pituglandol kombiniert mit Chlorcalcium-Lösung verlängern die Hypercalcämie nicht so bedeutend wie Parathyrenin.

6. Bei der Verlängerung der Hypercalcämie nach intravenöser Darreichung von Calcium zusammen mit Parathyrenin handelt es sich um etwas anderes als um die Hemmung der Calciumausscheidung, denn bei dem Ca-Ausscheidungsversuch wurde eine fast dem Blutcalciumspiegel entsprechende deutlich längerdauernde ver-

mehrte Ca-Ausscheidung im Harn und besonders im Kot nachgewiesen.

Ich danke hiermit Herrn Dr. Takeda für seine stete Anregung und Hilfe, Herrn Prof. Kakiuchi (Universität zu Tokyo) und Herrn Prof. Akamatsu (Mediz. Akademie zu Chiba) für ihre freundlichen Ratschläge zu dieser Arbeit.

## LITERATUR.

- Bell and Doisy (1920): Journ. of biol. chem., 44.  
Berkeley u. Martin, Cit. Biedl.  
Biedl, Innere Sekretion.  
Binger (1917-18): Journ. of pharm. and exp. therapie., 105.  
Billingheimer (1922): Klin. Wochenschr., 256.  
Brinkmann (1915): Bioch. Zeitschr., 95.  
Collip (1925): Journ. of biol. chem., 63.  
„ (1926): Journ. of the americ. med. assoc., 87.  
„ (1927): „ 88.  
Collip and Clark (1925): Journ. of biol. chem., 66.  
Clark (1920): Journ. of biol. chem., 43.  
Davidson (1925): Canad. med. assoc., 15.  
Dresel u. Katz (1922): Klin. Wochenschr., 32.  
Greenwald (1924): Journ. of biol. chem., 60.  
„ (1926): Journ. of biol. chem., 67.  
Greenwald and Gross (1925): Journ. of biol. chem., 66.  
Grant u. Gates (1925): Zbl. f. inn. Med. S. 533.  
Hasting and Hurry (1921): Journ. of biol. chem., 46.  
Herxheimer (1927): Klin. Wochenschr., 2268.  
Hoffman, Burst, Robinson (1927): Journ. of biol. chem., 73.  
Kylin u. Silversvärd (1923): Zeitschr. für d. ges. exp. Med., 43.  
Kramer and Tisdall (1921): Journ. of biol. chem., 46.  
Kitayama (1927): Okayama Igakukai-Zasshi, No. 444.  
Kusa (1925): Sei-Ikai-Zasshi.  
Lisser u. Shepardson (1926): Enderinology, 9, 383.  
Looney (1927): Journ. of biol. chem., 67.  
Leicher (1923): Archiv f. klin. Med., 141.  
MacCallum (1921): Journ. of biol. chem., 47.  
MacCallum and Voegtlin (1910-II): Journ. of exp. Med.  
Moritz (1925): Journ. of biol. chem., 66.  
Néurath (1911): Zeitschr. f. Kinderk., I.

- Nakamura (1925): Nippon-Naikagakkai-Zasshi, Juli.  
Okumura (1924): Aichi-Igakkai-Zasshi, Bd. 31.  
Poper (1926): Zeitschr. f. ges. exp. Med., 49.  
Sälvesen (1923): Journ. of biol. chem., 56.  
Sohl u. Pedley (1922): Journ. of biol. chem., 50.  
Swingle u. Weiner (1926): Amer. Journ. of phys., 65.  
Stewart u. Percival (1927): Bioch. journ., 21.  
Trendelenburg (1922): Arch. f. exp. Path. a. Pharm., 89.  
Wollheim (1924): Bioch. Zeitschr., 151.  
Yoshimura (1920): Nisshin-Igaku, 1079.  
Zondeck (1922): Bioch. Zeitschr., 132.

## ÜBER DEN EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DEN CALCIUMSTOFFWECHSEL (III).

VON

TADAO SEKITOO.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Universität,  
Okayama. Vorstand: Prof. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 18. März 1930)

In meiner vorigen Mitteilung (1929) habe ich schon bemerkt, dass das Calcium im Blut und im Harn des Kaninchens durch Zufuhr von Gallensäure deutlich vermehrt wird. Weiter habe ich (1930) festgestellt, dass die Ableitung der Galle nach aussen aus der Gallenblasenfistel eine allmählich mit der Zeit sich einstellende Hypocalcämie hervorruft, die durch die Zufuhr von Gallensäure wieder über den normalen Wert erhöht wird, und dass sich der Blutkalkgehalt bei experimentellem Stauungsikterus anfangs allmählich vermehrt, später aber vermindert. Auf Grund dieser Feststellungen kann man wohl annehmen, dass die Gallensäure zu der Regulation des Calciumstoffwechsels in inniger Beziehung steht.

Durch die Versuche von Berg, Hess und Schermann (1928) ist bekannt, dass die Ausschaltung des Sympathicus Hypocalcämie hervorruft und die unterabdominale Vagusdurchschneidung zur Hypercalcämie führt, dass also das Gleichgewicht des Calciums im Blut durch die Ausschaltung sowohl der sympathischen als auch der parasympathischen Nerven wenig stabil wird.

Zondek (1929) und Wollheimer (1929) behaupten, dass der Sympathicusreiz unter Ausschaltung des Vagus das Blut zur Calciumverminderung und Kaliumvermehrung, und umgekehrt der Vagusreiz unter Ausschaltung des Parasympathicus zur Calciumvermehrung und Kaliumverminderung führt. Im hiesigen Institut hat Tsuji (1929) gefunden, dass die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure, die von Misaki (1927), Taku (1928),

Murakami (1928) und Okamura (1928) bewiesen wurde, bei der Ausschaltung der N. splanchnici teilweise ausbleibt. Durch die Versuche vieler Autoren, wie von Zondek und anderen, ist schon allgemein bekannt, dass die Wirkung des Sympathicus in den Organen in der Richtung des Calciums liegt.

In dem oben erwähnten Sinne habe ich den Einfluss der subcutan oder peroral zugeführten Gallensäure auf den Blutkalkspiegel unter Ausschaltung der vegetativen Nerven untersucht, um einen Einblick zu gewinnen, wie sich die Gallensäurehypercalcämie zu dem vegetativen Nervensystem verhält.

## Experimenteller Teil.

### METHODIK.

Zum Versuch habe ich gut ausgewachsene Kaninchen benutzt, die unter möglichst gleichen Bedingungen 1–2 Wochen lang gehalten worden waren. Der Versuch wurde immer morgens früh in der nüchternen Zeit des Kaninchens ausgeführt, und erst nach Beendigung der Versuche wurde die Nahrung an die Kaninchen verfüttert. Wenn noch weitere Untersuchungen nötig waren, so wurden sie in der nächsten nüchternen Zeit ausgeführt. Aus den Ohrvenen wurde das Blut (ungefähr 5–7 ccm) mittelst Injektionsnadeln abgefangen und der Calciumgehalt des Blutserums nach der von Inoue modifizierten Methode von De Waad bestimmt.

Die Calciumbestimmung des Blutes wurde zuerst vor dem Versuch 1 oder 2 Mal, dann nach je 2 oder 3 Stunden fortlaufend vorgenommen. Dabei wurde immer dieselbe Menge Blut entnommen und jedesmal eine doppelte Bestimmung ausgeführt. Genaueres wird weiter unten angegeben.

### 1. EINFLUSS DER SPLANCHNICOTOMIE AUF DEN BLUTKALKGEHALT.

Es ist bekannt, dass das vegetative Nervensystem, besonders der Sympathicus, im Calciumstoffwechsel eine grosse Rolle spielt.

Nach Durchschneidung beider N. splanchnici dicht vor dem Eintritt ins Ganglion wurde in einem bestimmten Zeitintervall der Blutkalkgehalt untersucht, und dieser Wert mit dem vor der Operation verglichen.

TABELLE I.

Nr.	1	2	3	4	5	6
Datum.	15/I (1930)	15	17	18	24	25
Körpergewicht (g)	2540	2520	2200	2300	2020	2450
Vor Op.	14.8	14.2	14.1	14.5	14.4	13.9
Nach Op.						
1 St.		13.9				
2 „			11.3		12.6	
3 „	13.0					11.8
4 „				11.8	11.0	
5 „	12.3		10.5			11.4
Ca(mg%) 1 Tag.	12.4	12.8	9.7	12.6	11.7	11.3
2 „	13.4	13.1	12.5	12.8	12.5	12.5
3 „	14.4	13.8	13.3	13.8	13.2	
4 „	14.0	13.3	14.5	14.6	14.0	
5 „	14.0	14.4	14.1	14.3		
6 „	14.3	14.2	14.4	14.9		
7 „	14.5	14.3		14.0		
8 „	14.7	14.4				

Die Tabelle I. zeigt, dass sich der Blutkalkgehalt nach der Sympathicusdurchschneidung etwas vermindert und danach in Laufe von 4–5 Tagen den normalen Wert wieder erreicht. Wie schon oben erwähnt wurde, haben Berg, Hess und Schermann beobachtet, dass sich beim Hunde der Calciumgehalt des Serums durch Ausschaltung der N. splanchnici vermindert und dass diese Verminderung 1–2 Wochen lang dauert. In der vorigen Mitteilung habe ich schon bemerkt, dass der Blutkalkgehalt durch die fortlau-

fend wiederholte Blutentnahme und nach der Probelaparatomie allmählich herabgesetzt wird, um nach 22–48 Stunden wieder seinen normalen Wert zu erreichen.

Aus diesem Grunde glaube ich, dass diese vorübergehende Hypocalcämie nach der Splanchnicusdurchschneidung auf den Sympathicusreiz bei der Operation zurückzuführen ist.

## II. EINFLUSS DER GALLENSÄUREZUFUHR AUF DEN BLUTKALKGEHALT BEI SYMPATHICOTOMIERTEN KANINCHEN.

In diesem Versuche benutzte ich ein Kaninchen, welches nach der Sympathicotomie zur Erholung des allgemeinen Zustandes 2–3 Wochen lang gehalten worden war. Nach der subcutanen (pro. Kg. Körpergewicht 1–1.5 ccm) oder peroralen (pro. Kg. Körpergewicht 10–15 ccm) Zufuhr einer 1%igen Natriumeholatlösung wurde der Blutkalkgehalt in einem bestimmten Zeitintervall untersucht und der gefundene Wert mit den Kontrollen (Versuch 1 der Tabelle II) und mit dem vor der Gallensäurezufuhr verglichen. Als Kontrolle wurde der Einfluss der physiologischen Kochsalzinjektion auf den Blutkalkgehalt beim sympathicotomierten Kaninchen beobachtet.

Die Tabelle II. zeigt, dass der Blutkalkgehalt nach der Splanchnicotomie durch die physiologische Kochsalzinjektion oder Gallensäurezufuhr kaum beeinflusst, sogar dadurch etwas herabgesetzt wird. Ich habe schon bemerkt, dass die fortlaufend wiederholte Blutentnahme einen allmählich absinkenden Blutkalkspiegel hervorruft. Aus diesem Grunde nehme ich an, dass die jeweilige Verminderung des Blutkalkgehaltes bei Zufuhr von Gallensäure nach der Splanchnicotomie auf der fortgesetzten Blutentnahme beruht. Ich habe schon in den früheren Mitteilungen bewiesen, dass überschüssige Gallensäurezufuhr beim normalen Kaninchen Hypercalcämie erzeugt. Nach Tsuji bleibt die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure bei Ausschaltung der N. splanchnici teilweise aus. Nach den Untersuchungen von Zondek, Kitayama (1927), Mosai u. Kawashima (1925–26) wirkt Adrenalin hypo-

TABELLE II.  
Versuch 1. (Kontrolle)

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Datum.	13/VIII (1929)	14	15	27	28	30	1/IX	3
Körpergewicht (g)	2080	2280	1800	2300	2250	2150	2050	2200
1 St. Vor Injek.	12.8	12.8	13.4	13.0	12.7	13.0	12.7	12.2
5 Min.	12.6	13.4		12.8	12.9	12.8	12.8	11.8
Nach Injek.								
Ca(mg%) 1 St.		12.6	13.5	12.9	12.7	12.9	12.2	12.2
3 „	12.1	12.8		12.4	12.5	13.0	12.2	11.5
5 „		12.6	12.9	12.6	12.3	12.3	12.5	12.0
7 „	12.2			12.5		12.6		11.7

Versuch 2. (subeutane Zufuhr nach Splanchnicotomie.)

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Datum.	22/VII (1929)	23	29	29	30	5/VIII	6	7
Körpergewicht (g)	2300	2200	2380	2250	2350	1900	2000	2150
Cholatlösung (cem)	3.5	2.2	2.4	3.3	2.4	2.9	3.0	3.2
1 St. Vor 5 Min.			13.2	12.5	14.3	12.1		14.2
	10.7	14.0	13.4	12.3	14.2	12.3	12.3	14.5
Nach 1 St.			13.3	12.3	14.1	12.1	12.1	14.2
Ca(mg%) 3 „	10.2	13.7	13.0	12.1	13.5	12.3	11.9	14.4
5 „			12.3	12.1	12.3	11.9	11.2	13.7
7 „			12.5		12.6		12.2	14.2

## Versuch 3. (perorale Zufuhr nach Splanchnicotomie.)

Nr.	1	2	3	4	5	6
Datum.	30/I (1930)	30	31	14/II	15	15
Körpergewicht (g)	2230	2250	2420	2230	2400	2450
Cholatlösung (ccm)	22.0	23.0	24.5	33.0	36.0	37.0
Vor	13.7	14.2	13.1	13.3	13.0	13.9
Nach 1 St.	13.1					13.1
Ca(mg%) 2 „		13.0			12.3	
3 „			12.8	12.5		
4 „	12.8					13.7
5 „		12.6			12.2	
6 „			12.1	12.6		

calcämisch. Es ist bekannt, dass die Gallensäure gegen das Adrenalin, das den Sympathicus reizend beeinflusst, antagonistisch wirkt.

Auf Grund der oben erwähnten Tatsachen kann man wohl annehmen, dass die Gallensäure im Sinne der Sympathicuslähmung gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt.

## III. EINFLUSS DER VAGOTOMIE AUF DEN BLUTKALKGEGHALT.

In diesem Versuche habe ich die beiden Nervi vagi dicht unter dem Zwerchfell durchgeschnitten und den Blutkalkgehalt genau wie bei der Sympathicotomie untersucht.

Nach verschiedenen Autoren wie z.B. Berg vermehrt sich der Blutkalkgehalt durch die unterabdominale Vagusdurchschneidung. In ihren Experimenten haben sie bemerkt, dass der Blutkalkspiegel nur einmal am 5.-13. Tage nach der Vagotomie deutlich steigt und erst danach wieder zur Norm zurückkehrt. In meinen Versuchen konnte ich niemals eine solche Zunahme feststellen. Aus der Tabelle III kann man ersehen, dass der Blutkalkspiegel nach der abdomi-

TABELLE III.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Datum.	3/XII (1929)	3	4	7	7	23	24	42
Körpergewicht (g)	2150	2260	2180	2920	2750	2380	2250	2380
Vor	14.9	14.4	14.5	14.3	14.5	14.3	14.4	14.3
Nach 1 St.			14.1					
2 "		14.0			14.1			12.8
3 "	14.2		13.0	13.2		12.6		
Ca(mg%) 4 "		13.7					13.4	
5 "					13.6			
6 "	13.9			12.7				
1 Tag.						12.1	12.7	12.8
2 "						12.6	13.1	13.1
3 "						13.6	14.0	14.6
4 "						13.9	12.7	14.3
5 "						13.2	14.0	14.3
6 "						13.8	13.8	13.4
7 "						14.2	14.4	14.1
8 "						13.1	14.5	13.9
9 "						14.5	13.7	14.0
10 "						13.4	14.6	14.6
11 "						14.4	14.6	14.4

nenalen Vagotomie fast unbeeinflusst bleibt. Die Wiederherstellung des Blutkalkspiegels zum normalen Wert findet bei meinen Versuchen nach der Vagotomie schneller als nach der Splanchnicotomie statt. Schon viele Autoren, wie Zondek, haben beobachtet, dass der Calciumstoffwechsel hauptsächlich durch die Sympathicusspannung besorgt wird. Mein Versuchsergebnis stimmt gut mit der Anschauung von Zondek überein.

#### IV. EINFLUSS DER GALLENSÄUREZUFUHR AUF DEN BLUTKALK- GEHALT BEI VAGOTOMIERTEN KANINCHEN.

Genau wie beim sympathicotomierten Kaninchen wurde der Blutkalkspiegel im Laufe von 2–3 Wochen nach der Vagotomie untersucht und zwar einerseits als Kontrolle durch subcutane Injektion einer physiologischen Kochsalzlösung, (Versuch 1 der Tabelle IV) andererseits durch perorale oder subcutane Zufuhr von Gallensäure. (Versuch 2 und 3 der Tabelle IV).

Wie im Kontrollversuch (Versuch 1 der Tabelle IV) gezeigt wird, bleibt der Blutkalkgehalt bei physiologischer Kochsalzinjektion fast unverändert. Im Versuch 2 der Tabelle IV steigt der Blutkalkgehalt bei 4 von 7 Fällen an. Diese Steigerung beträgt in den meisten Fällen ca. 5%, nur in einem Fall 7%. Aber im Versuch 3 der Tabelle IV sieht man, dass der Blutkalkgehalt beim vagotomierten Kaninchen durch die perorale Zufuhr der Gallensäure, verglichen mit der Kontrolle, fast keine Veränderung zeigt.

Es ist merkwürdig, dass der Blutkalkgehalt durch perorale Zufuhr kaum verändert wird, während er durch subcutane Zufuhr

TABELLE IV.  
Versuch 1. (Kontrolle)

Nr.	1	2	3	4	5
Datum.	27/I (1930)	27	28	29	29
Körpergewicht (g)	2700	2330	2180	1700	2400
Vor	14.5	14.2	14.2	14.1	14.2
Nach 1 St.			14.5		14.0
Ca(mg%) 2 „		14.1		13.9	
3 „	14.1				
4 „			14.0		13.8
5 „		13.9		14.2	
6 „	14.4				

## Versuch 2. (subcutane Zufuhr nach Vagotomie.)

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Datum.	17/XII (1929)	17	18	18	9/I (1930)	9	10
Körpergewicht (g)	2570	2880	1870	2180	2200	2000	2150
Cholatlösung (cem)	2.6	2.9	1.9	2.2	3.3	3.0	3.2
Vor	14.3	13.9	13.9	15.0	14.2	14.7	14.3
Nach 1 St.			14.1	14.3		14.7	
Ca(mg%) 2 "		14.8			13.4		
3 "	13.9					15.4	15.1
4 "			13.8	14.9	14.4		
5 "		13.4					13.7
6 "	13.8						

## Versuch 3. (perorale Zufuhr nach Vagotomie.)

Nr.	1	2	3	4	5	6
Datum.	31/I (1930)	1/II	3	15	15	16
Körpergewicht (g)	2200	2900	2750	2800	2050	2820
Cholatlösung (cem)	22.0	29.0	27.5	42.0	31.0	42.0
Vor	13.8	14.3	14.1	13.1	13.0	14.3
Nach 1 St.			13.7			13.5
Ca(mg%) 2 "		13.5			13.1	
3 "	13.7			12.4		
4 "			13.7			12.9
5 "		13.4			12.5	
6 "	13.7			12.4		

zunimmt, obwohl diese nur in sehr geringem Grade stattfindet. In hiesigem Institut hat schon Kaziro (1927) gefunden, dass die Stickstoff- und Schwefelsäureausscheidung im Harn bei peroraler Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird, während dagegen Karasawa (1927) und Hatakeyama (1927) in ihren Versuchen bewiesen haben, dass dieselbe bei subcutaner Zufuhr herabgesetzt wird. Daraus hat Kaziro geschlossen, dass dieser Unterschied durch die Affinität der Leberzellen mit den Gallensalzen zu stande kommt, die von G. Bayer (1908) nachgewiesen worden ist. Ich habe die Gallensäure dem Tier peroral gegeben. Dadurch werden sie von der Darmwand resorbiert, in die Leber gebracht, dort von den Leberzellen fixiert und von dem allgemeinen Blutstrom ferngehalten. Deswegen steht die Gallensäure bei peroraler Zufuhr in viel innigerem Zusammenhang mit der Nervenwirkung in der Leber, jedoch kommt diese Nervenwirkung, verglichen mit der allgemeinen Wirkung bei subcutaner Zufuhr, weniger in Betracht. Beim abdominal vagotomierten Kaninchen kommt die Wirkung der peroral zugeführten Gallensäure auf den Parasympathicus nicht in Betracht. Dagegen wirkt bei subcutaner Zufuhr die Gallensäure allgemein, und zwar auf den Parasympathicus reizend und auf den Sympathicus lähmend. So ist Hypercalcämie des vagotomierten Kaninchens bei subcutaner Zufuhr der Gallensäure die Folge.

Aus diesem Grunde nehme ich an, dass die Gallensäure auf den Vagus im Sinne des hypotonischen Zustandes vom antagonistisch wirkenden Sympathicus reizend wirkt.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die hypercalcämische Wirkung der Gallensäure wird durch Splanchnicotomie ganz aufgehoben, der Calciumgehalt des Blutes bei splanchnicotomierten Kaninchen durch perorale oder subcutane Zufuhr der Gallensäure sogar etwas herabgesetzt.

2. Auf Grund der Tatsachen scheint mir die Gallensäure gegen das Adrenalin im Sinne der Sympathicuslähmung zu wirken.

3. Die perorale Zufuhr der Gallensäure hat bei abdominal vagotomierten Kaninchen keinen Einfluss auf den Blutkalkgehalt, aber die subcutane Zufuhr hat eine leichte Vermehrung des Blutkalkgehaltes zur Folge.

4. Aus diesen Daten scheint mir hervorzugehen, dass die Gallensäure auf den Vagus im Sinne des antagonistisch wirkenden Sympathicus reizend wirkt.

## LITERATUR.

- Bayer, G. (1908): *Bioch. Zeitschr.*, **13**, 215.  
Berg, B. N., Hess, A. F. u. Scherman, E. (1928): *Journ. of exp. Med.*, **47**, 105.  
Hatakeyama, T. (1927): *Journ. of Bioch.*, **8**, 261.  
Kaziro, K. (1927): *Journ. of Bioch.*, **7**, 293.  
Karasawa, R. (1927): *Journ. of Bioch.*, **7**, 145.  
Kitayama, K. (1927): *Okayama Igakkai Zasshi*, Nr. 441, 1.  
Misaki, K. (1927): *Journ. of Bioch.*, **8**, 235.  
Mozai, A. u. Kawashima, S. (1925–26): *Nippon Naikagakkai Zasshi*, **13**, 271.  
Murakami, K. (1928): *Journ. of Bioch.*, **9**, 261.  
Okamura, Teiji (1928): *Journ. of Bioch.*, **9**, 271 u. 445.  
Sekitoo, T. (1929): *Journ. of Bioch.*, **11**, 251.  
„ (1930): „ **11**, 391.  
Taku, A. (1928): *Journ. of Bioch.*, **9**, 299.  
Tsuji, K. (1930): *Okayama Igakkai Zasshi*, **42**, 431.  
Wollheimer, E. (1929): *Bioch. Zeitschr.*, **151**, 416.  
Zondek, S. G. (1929): *Arch. f. exp. Path. u. Pharmak.*, **143**, 192.



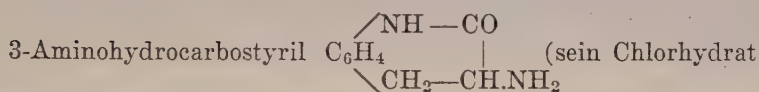
# ÜBER DIE ANTIPYRETISCHE WIRKUNG VON 3-AMINOHYDROCARBOSTYRIL, SEINEN ISOMEREN UND DERIVATEN.

VON

KAZUO WATANABE

(Aus dem Sasaki-Laboratorium zu Tokio.)

(Eingegangen am 19. März 1930.)



kurzweg 3-Astyl genannt) wurde von H. Ueda in hiesigem Laboratorium mittelst der Glycinanhydridmethode nach Sasaki (T. Sasaki 1921) dargestellt. (H. Ueda 1928.) Diese Substanz hat interessante biologische Eigenschaften, indem sie besonders auf das Zentralnervensystem einwirkt und Versuchstieren eine eigenartige, motorische Syndrome hervorruft. Sasaki hält die Syndrome für extrapyramidal-motorisch (im weiteren Sinne) und betrachtet die Substanz als zu einem amyostatischen Gift gehörig.\* In Betracht dieser Wirkung als eines Hirnstamm-Effektes ist auch von Interesse zu eruieren, wie 3-Astyl sich gegen das sog. Wärmezentrum verhält. Zumal steht es auch strukturmisch in gewisser Beziehung zu Substanzen der Chinolin- und Aminophenol-Reihe. In der Tat zeigt es bei Versuchstieren eine eklatante antipyretische Wirkung. Diese ist allerdings zwar theoretisch interessant, aber wegen des zu kleinen Abstandes zwischen der Heil- und Vergiftungsdosis praktisch ohne Bedeutung.

Um einige Beiträge zur Erforschung der Beziehungen zwischen biologischer Wirkung und chemischer Konstitution zu liefern, schien es mir doch wünschenswert, auch seine Isomeren: 1-Amino-

\* "Takaoki Sasaki, Über amyostatische Gifte" wird demnächst erscheinen.

hydrocarbostyryl (E. Fischer und H. Kurzel, 1883) und 7-Aminohydrocarbostyryl (S. Gabriel und J. Zimmermann, 1879), und weiterhin p- und m-Aminophenylalanin etc. in bezug auf die antipyretische Wirkung einer vergleichenden Untersuchung zu unterziehen. Es hat sich nämlich herausgestellt, dass die letzte Wirkung auch dem 1- und 7-Körper deutlich zukommt, während ihnen merkwürdiger Weise kein amyostatischer Effekt innewohnt. Die kaum in Betracht kommende antipyretische Wirkung von p- und m-Aminophenylalanin ist insofern bemerkenswert, als 3-Aminohydrocarbostyryl nichts anderes als ein Dehydrationsprodukt des o-Aminophenylalanins ist. Ringschliessung und Änderung der physikalischen Eigenschaften scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen. Was das Verhalten des Blutzuckers des Kaninchens bei der Darreichung von 3-Astyl betrifft, so zeigte die Untersuchung K. Yasui's im hiesigen Laboratorium, dass er durch die Injektion von 3-Astyl unverändert bleibt und erst bei der Krampferscheinung nur etwas erhöht ist. (Genaueres wird später publiziert.) Bei der Darstellung der Präparate erfreute ich mich der freundlichen Unterstützung der HHn. Kollegen, H. Ueda und S. Fujisawa, wofür ich ihnen meinen besten Dank sage.

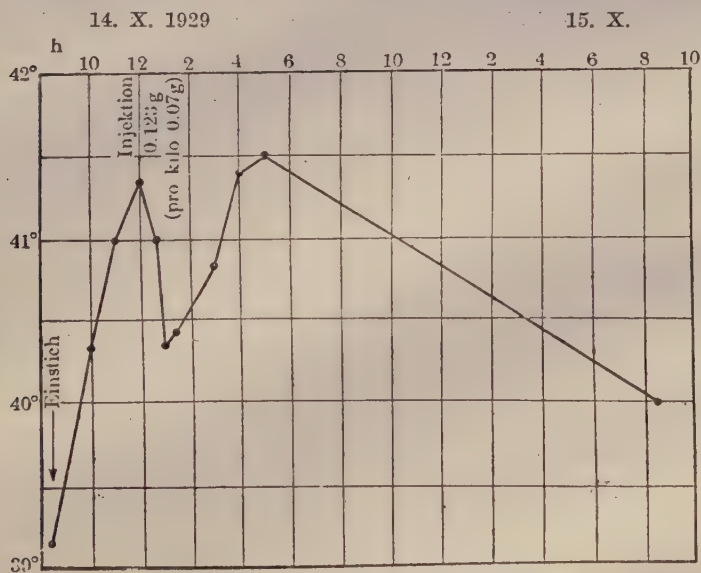
### Experimenteller Teil,

Als Versuchstiere benutzte ich in allen Fällen gesunde Kaninchen. Alle Kaninchen wurden täglich mit ca. 500 g Okara, in zwei Mahlzeiten geteilt, gefüttert. Die Temperatur wurde durch den Wärmestich von Ed. Aronsohn und J. Sachs (1885) künstlich erhöht und falls sich die Temperatur über 1.5°C im künstlich erhöht, und falls sich die Temperatur über 1.5°C im suchung weiter fortgesetzt. Nach der Operation wurde dem Kaninchen das Futter wie gewöhnlich gegeben. Die Versuchssubstanzen wurden in Wasser gelöst. Die schwer löslichen wurden unter der Hinzufügung von verdünnten Nat. carbonat- resp. Salzsäure-Lösungen in Wasser gelöst und den Tieren intraperi-

toneal injiziert. Die Körpertemperatur wurde stündlich oder halbstündlich, später zweistündlich im Rektum gemessen. Da die Körpertemperatur der Kaninchen verhältnismässig labil ist, untersuchte ich möglichst zahlreiche Fälle, um einen eventuellen Irrtum zu vermeiden. Die Einflüsse der Darreichung der Versuchssubstanz sind im aufsteigenden Schenkel der Temperaturkurve, d.h. bald nach dem Wärmestich, und im absteigenden Schenkel, d.h. weit später nach demselben, oft nicht gleich. Aus dem Grunde injizierte ich die Kaninchen zu verschiedenen Zeiten nach der Operation, um einen sicheren Einblick zu gewinnen.

### 1. Versuche mit 3-Astyl.

Wie die Tabelle I zeigt, wurden 24 Injektionen von 3-Astyl an 19 Kaninchen ausgeführt. Falls die Injektionsdosis des 3-Astyls 0.05–0.1 g Kilo betrug, sank die Körpertemperatur ausnahmslos, obwohl der Grad der Körpertemperaturerniedrigung verschieden



Kurve Nr. 1. Kaninchen Nr. 45. 3-Astyl.

TABELLE I. 3-Aminohydrocarbostyryl.

Nr. d. Kanin- chens	Datum d. Ver- suchs (1929)	Injektions- dosis		Zeitdauer von W.S. bis z. Inj.	Körpertemperatur			Sinken d. Temp.	Zeitdauer v. d. Inj. bis z. tiefsten Temp.	Bemer- kung
		(g)	pro kg		vor. d. W.S.	vor. d. Inj.	nach d. Inj.			
7 ♂	7.VII	0.125	0.05	4.00	38.7	40.5	39.9	-0.6	3.00	
„	8.VII	0.063	0.025	24.00	38.7	40.7	40.7	0		
„	8.VII	0.125	0.05	30.00	38.7	41.2	40.8	-0.4	3.00	
3 ♂	8.VII	0.205	0.13	3.20	38.4	42.3	40.3	-2.0	3.00	Krampf
2 ♀	11.VII	0.118	0.05	5.50	38.8	41.5	41.0	-0.5	3.30	
8 ♀	11.VII	0.100	0.05	26.30	38.9	40.7	40.5	-0.2	2.00	
9 ♀	12.VII	0.116	0.05	22.30	39.0	41.7	41.2	-0.5	2.00	
10 ♀	13.VII	0.118	0.05	26.10	39.7	41.3	41.1	-0.2	3.00	
38 ♀	15.IX	0.107	0.05	5.30	39.4	40.7	40.5	-0.2	1.00	
„	16.IX	0.107	0.05	28.00	39.4	40.9	40.6	-0.3	1.00	
39 ♀	15.IX	0.111	0.05	4.20	39.0	41.5	41.3	-0.2	1.00	
40 ♀	18.IX	0.161	0.07	4.30	39.2	41.7	40.7	-1.0	1.10	Krampf
„	19.IX	0.138	0.06	25.30	39.2	41.1	40.0	-1.1	1.30	Krampf
41 ♀	18.IX	0.144	0.07	3.20	38.7	41.6	41.4	-0.2	1.30	
„	19.IX	0.123	0.06	25.20	38.7	41.3	40.8	-0.5	1.30	
42 ♂	25.IX	0.150	0.07	5.40	39.0	42.0	41.1	-0.9	2.30	
26 ♀	25.IX	0.145	0.07	5.20	38.9	41.6	40.9	-0.7	2.30	
33 ♀	1.X	0.208	0.09	5.15	38.6	42.2	39.0	-3.2	3.30	
34 ♀	1.X	0.202	0.10	5.00	38.5	41.8	38.8	-3.0	3.00	Krampf
37 ♀	7.X	0.124	0.08	4.30	38.7	41.3	39.8	-1.5	4.10	Krampf
45 ♀	14.X	0.123	0.07	3.25	39.1	41.3	40.3	-1.0	1.00	
46 ♀	14.X	0.158	0.08	5.30	39.3	41.5	40.3	-1.2	2.30	
47 ♀	14.X	0.135	0.07	5.15	38.8	41.2	40.6	-0.6	0.30	
50 ♀	19.X	0.108	0.06	6.00	39.2	41.4	40.2	-1.2	2.15	

war. Der Grad der Herabsetzung ging ungefähr parallel mit der Injektionsdosis. Besonders war die Erscheinung auffallend bei der Darreichung von über 0.07 g 3-Astyl pro Kilo. Die Temperaturkurve I zeigt ein Beispiel. Bei 4 Fällen trat der typische Krampf ein, und die Temperatur stürzte stark herab. Die Herabsetzung der Temperatur dauerte meistens 1–3 Stunden nach der Injektion an; danach stieg sie wieder auf.

## II. Versuche mit *p*-Aminophenylalanin.

5 Kaninchen wurden 0.1–0.3 g pro Kilo von *p*-Aminophenylalanin in wässriger Lösung intraperitoneal injiziert. Wie in der Tabelle II ersichtlich ist, trat eine auffallende Temperaturerniedrigung niemals ein, sondern die Herabsetzung war nur 0.1–0.3°C oder die Versuchssubstanz blieb ganz einflusslos.

TABELLE II. *p*-Aminophenylalanin.

Nr. d. Kaninchens	Datum d. Versuchs (1929)	Injektionsdosis		Zeitdauer vom W.S. bis z. Inj.	Körpertemperatur			Sinken d. Temp.	Zeitdauer v. d. Inj. bis z. tiefsten Temp.
		(g)	pro kg		vor. d. W.S.	vor. d. Inj.	nach d. Inj.		
11 ♀	17.VII	0.206	0.1	5.25	39.3	41.3	41.2	–0.1	1.00
„	18.VII	0.206	0.1	24.30	39.3	41.7	41.5	–0.2	2.00
12 ♀	17.VII	0.201	0.1	5.00	39.5	41.7	41.8	+0.1	
„	18.VII	0.201	0.1	24.00	39.5	41.0	40.8	–0.2	2.00
13 ♀	20.VII	0.404	0.2	8.00	39.0	42.0	42.0	0	
15 ♀	21.VII	0.446	0.24	25.10	39.1	41.6	41.3	–0.3	1.00
16 ♂	21.VII	0.450	0.3	27.00	39.1	40.9	40.7	–0.2	1.00

## III. Versuche mit *m*-Aminophenylalanin.

8 Kaninchen wurden untersucht. Wie die Tabelle III zeigt, wurden *m*-Aminophenylalanin 0.1–0.5 g pro Kilo intraperitoneal injiziert. Bei einem Fall erniedrigte sich die Temperatur nicht. Aber bei den anderen 7 Fällen sank die Körpertemperatur ab, obwohl der Grad der Herabsetzung nicht sehr bedeutend war.

Die grösste Abnahme war  $0.5^{\circ}\text{C}$  bei Kaninchen Nr. 7 durch die Injektion von 0.2 g pro Kilo. Der Grad der Temperaturabnahme ging nicht immer parallel mit der Injektionsdosis.

TABELLE III. m-Aminophenylalanin.

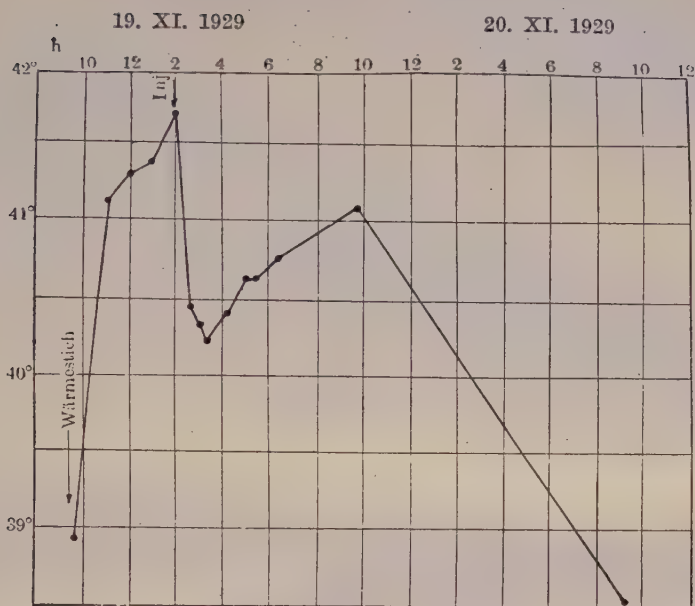
Nr. d. Kanin- chens	Datum d. Versuchs (1929)	Injektions- dosis		Zeitdauer vom W.S. bis z. Inj.	Körper- temperatur			Sinken d. Temp.	Zeitdauer v. d. Inj. bis z. tiefsten Temp.
		(g)	pro kg		vor. d. W.S.	vor. d. Inj.	nach d. Inj.		
18 ♀	1.VIII	0.260	0.1	5.30	38.9	42.2	41.9	-0.3	4.00
21 ♀	1.VIII	0.201	0.1	7.20	38.8	40.9	40.7	-0.2	2.00
22 ♀	2.VIII	0.496	0.2	8.50	39.2	41.4	41.1	-0.3	1.00
7 ♂	8.VIII	0.472	0.2	6.30	38.7	42.2	41.7	-0.5	1.00
25 ♀	12.VIII	0.500	0.3	4.20	39.2	41.9	42.0	+0.1	
24 ♀	12.VIII	0.600	0.3	4.40	39.0	41.5	41.3	-0.2	1.00
30 ♀	4.IX	0.930	0.5	7.10	39.1	41.5	41.1	-0.4	1.00
34 ♀	6.IX	1.095	0.5	6.00	39.0	41.3	41.1	-0.2	2.00

#### IV. Versuche mit 1-Aminohydrocarbostyryl

Wie die Tabelle IV zeigt, wurden 4 Kaninchen untersucht. 1-Aminohydrocarbostyryl wirkte sehr stark antipyretisch. Schon 0.03 g pro Kilo setzten die Temperatur  $0.5^{\circ}\text{C}$  herab. Der Grad des Sinkens der Temperatur ging fast parallel mit der Injektionsdosis. Die Substanz hatte eine stärkere antipyretische Wirkung als 3-Astyl. Die Temperaturkurve Nr. 2 zeigt ein Beispiel. Aber wegen starker Giftigkeit der Substanz starben die Kaninchen schon bei der Darreichung von 0.05 g pro Kilo, sodass sie praktisch kaum von Bedeutung ist.

#### V. Versuche mit 7-Aminohydrocarbostyryl.

Wie in der Tabelle V ersichtlich ist, wurden 6 Injektionen an 4 Kaninchen ausgeführt. 7-Aminohydrocarbostyryl war schwer in Wasser, verdünnten Säuren und Alkalien löslich und wurde



Kurve Nr. 2. Kaninchen Nr. 64. 1-Aminohydrocarbostyryl.

TABELLE IV. 1-Aminohydrocarbostyryl.

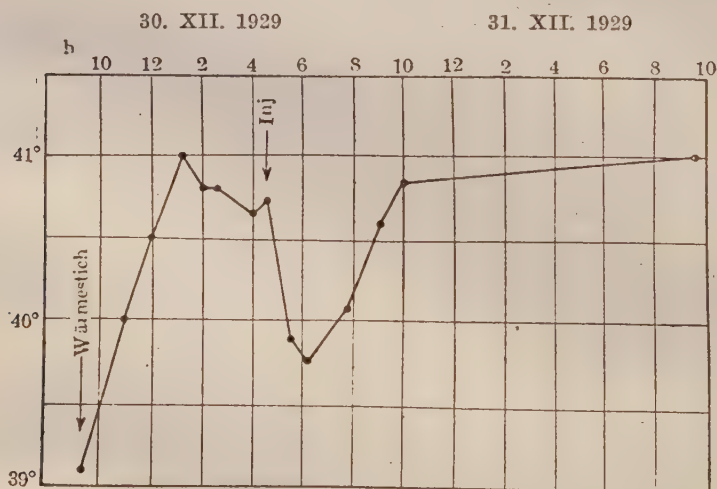
Nr. d. Kaninchens	Datum d. Versuchs (1929)	Injektionsdosis		Zeitdauer vom W.S. bis z. Inj.	Körpertemperatur			Sinken d. Temp.	Zeitdauer v. d. Inj. bis z. tiefsten Temp.	Bemerkung
		(g)	pro kg		vor. d. W.S.	vor. d. Inj.	nach d. Inj.			
58 ♀	13.XI	0.113	0.05	5.20	39.2	41.4	39.2	-2.2	0.40	40 St. n. d. Inj. +
64 ♂	19.XI	0.111	0.046	4.20	38.9	41.7	40.2	-1.5	1.30	48 St. n. d. Inj. +
75 ♂	19.XII	0.140	0.07	6.40	39.1	40.6	38.6	-2.0	2.00	20 St. n. d. Inj. +
74 ♂	18.XII	0.065	0.03	4.30	39.2	40.3	39.8	-0.5	2.30	

daher bei der Darreichung von 0.1–0.2 g pro Kilo meistens in Emulsion mit Olivenöl intraperitoneal injiziert. In allen Fällen trat die Temperaturerniedrigung ein. Temperaturkurve Nr. 3

zeigt ein Beispiel. Der Grad des Sinkens der Temperatur war fast gleich wie bei 3-Astyl. Die Substanz ist aber sehr wenig giftig. Wenn sie fabrikmässig preiswert dargestellt werden könnte, ist sie vielleicht von praktischen Nutzen. Jedenfalls ist es eine interessante Tatsache, dass alle Arten Aminohydrocarbostyryl antipyretische Wirkung haben, obwohl die Stellung der  $\text{NH}_2$ -Gruppe verschieden ist.

TABELLE V. 7-Aminohydrocarbostyryl.

Nr. d. Kaninchens	Datum d. Versuchs (1929)	Injektions-dosis		Zeitdauer vom W.S. bis z. Inj.	Körpertemperatur			Sinken d. Temp.	Zeitdauer v. d. Inj. bis z. tiefsten Temp.
		(g)	pro kg		vor. d. W.S.	nach d. Inj.	vor. d. Inj.		
78 ♀	22.XII	0.426	0.2	4.00	39.3	41.6	39.9	-1.7	3.00
76 ♀	26.XII	0.183	0.1	6.20	39.5	40.5	39.8	-0.7	2.00
83 ♀	30.XII	0.244	0.1	7.00	39.1	40.7	39.2	-1.5	2.00
83 ♀	26.XII	0.244	0.1	7.00	38.5	41.0	40.0	-1.0	1.00
83 ♀	27.XII	0.171	0.07	26.00	38.5	41.1	40.9	-0.2	2.00
84 ♀	6.I(1930)	0.160	0.07	6.00	38.6	40.2	39.5	-0.7	1.00



Kurve Nr. 3. Kaninchen Nr. 83. 7-Aminohydrocarbostyryl.

## VI. Versuche mit Diacetyl-p-Aminophenylalanin.

Salicylsäure nimmt bekanntlich in ihrer antipyretischen Wirkung durch die Acetylierung—unter Bildung von Acetylsalicylsäure—stark zu. Wie sich die antipyretische Wirkung von p-Aminophenylalanin auch durch die Acetylierung verändert, ist eine interessante Frage, abgesehen von verschiedenen anderen Veränderungen seiner Eigenschaften durch die Acetylierung. Bei 7 Kaninchen wurde 0.2–0.5 g pro Kilo Diacetyl-p-Aminophenylalanin intraperitoneal injiziert. Wie in der Tabelle VI ersichtlich ist, trat die Temperaturerniedrigung nach der Injektion nicht ein, sodass man schliessen kann, dass die Substanz keine antipyretische Wirkung besitzt und in diesem Falle auch die Acetylierung keinen Einfluss auf die Wirkung entfaltet.

TABELLE VI. Diacetyl-p-Aminophenylalanin.

Nr. d. Kaninchens	Datum d. Versuchs (1929)	Injektionsdosis		Zeitdauer vom W.S. bis z. Inj.	Körpertemperatur			Sinken d. Temp.	Zeitdauer v. d. Inj. bis z. tiefsten Temp.
		(g)	pro kg		vor. d. W.S.	vor. d. Inj.	nach d. Inj.		
20 ♀	27.VII	0.400	0.2	4.00	38.7	41.9	42.0	+0.1	
23 ♀	2.VIII	0.384	0.2	5.20	39.3	41.5	41.2	-0.3	1.40
8 ♀	15.VIII	0.546	0.3	5.00	38.5	41.6	41.9	+0.3	
27 ♀	21.VIII	0.666	0.3	4.30	39.1	42.7	42.5	-0.2	1.00
29 ♀	26.VIII	0.600	0.3	26.00	39.1	41.6	41.5	-0.1	1.00
31 ♀	26.VIII	0.400	0.2	4.45	39.0	41.4	41.6	+0.2	
32 ♀	29.VIII	1.000	0.5	26.30	39.0	41.0	40.8	-0.2	1.00

## VII. Versuche mit Diacetyl-3-Aminohydrocarbostyryl.

Da die Acetylierung der Substanz, ausser der Verstärkung der antipyretischen Wirkung oft ihre Giftigkeit vermindert (zit. nach Fränkel), ist die Acetylierung von 3-Aminohydrocarbostyryl noch interessanter als die von p-Aminophenylalanin. Da Diacetyl-3-Aminohydrocarbostyryl in Wasser, verdünnten Säuren und Alkalien

sehr schwer löslich ist, wurde es in Emulsion mit Olivenöl intraperitoneal injiziert, oder als Suspension in Wasser mit dem Gummischlauch per os dargereicht. Wie die Tabelle VII zeigt, sank die Körpertemperatur ausnahmslos ab. Der Grad des Sinkens der Temperatur war fast gleich wie bei der Injektion von 3-Astyl. Die Dauer der Körpertemperaturerniedrigung war etwas länger als bei 3-Astyl. Niemals trat der Krampf ein, obwohl die Substanz bis 0.2 g pro Kilo dargereicht wurde. Bei peroraler Zufuhr nahm die Temperatur nicht so bedeutend ab wie bei der Injektion. Die Verminderung der Giftigkeit beruht auf der Acetylierung der Substanz. Jedenfalls ist beachtenswert, dass die Acetylierung von 3-Aminohydrocarbostyryl seine amyostatische Wirkung in den Hintergrund zurückdrängt, dagegen seine antipyretische Wirkung unberührt lässt.

TABELLE VII. Diacetyl-3-Aminohydrocarbostyryl.

Nr. d. Kaninchens	Datum d. Versuchs (1929)	Injektionsdosis		Zeitdauer vom W.S. bis z. Inj.	Körpertemperatur			Sinken d. Temp.	Zeitdauer v. d. Inj. bis z. tiefsten Temp.
		(g)	pro kg		vor. d. W.S.	vor. d. Inj.	nach d. Inj.		
62 ♀	28.XI	0.245	0.1	5.50	38.3	41.0	38.8	-2.2	3.00
66 ♂	2.XII	0.227	0.1	3.45	38.8	41.0	40.0	-1.0	4.30
67 ♀	3.XII	0.232	0.1	5.10	38.5	41.2	40.0	-1.2	2.20
59 ♀	5.XII	0.120	0.05	4.30	39.7	41.3	41.1	-0.2	1.20
70 ♂	10.XII	0.322	0.2	26.10	39.4	41.2	39.8	-1.4	3.30
75 ♂	12.XII	0.201	0.1	4.30	39.0	41.1	40.6	-0.5	1.30(per os)
77 ♀	13.XII	0.283	0.13	4.25	39.1	41.2	40.4	-0.8	1.30 „
79 ♀	14.XII	0.403	0.19	4.00	39.1	41.2	40.8	-0.4	1.00 „

## ZUSAMMENFASSUNG.

1. 3-Astyl wirkt stark antipyretisch. Der Spielraum zwischen der Heil- und Vergiftungsdosis ist aber zu gering, sodass seine praktische Anwendung kaum in Betracht kommt.

2. p-Aminophenylalanin hat keine antipyretische Wirkung.
3. Dem m-Aminophenylalanin scheint eine geringe antipyretische Wirkung innewohnen.
4. 1-Aminohydrocarbostyryl wirkt sehr stark antipyretisch, ist jedoch wegen seiner starken Giftigkeit praktisch kaum von Bedeutung.
5. 7-Aminohydrocarbostyryl hat fast dieselbe antipyretische Wirkung wie 3-Astyl.
6. Die Acetylierung von p-Aminophenylalanin hat keinen Einfluss auf seine antipyretische Wirkung.
7. Diacetyl-3-Aminohydrocarbostyryl hat fast dieselbe antipyretische Wirkung wie 3-Astyl, während seine Giftigkeit stark in den Hintergrund tritt.

## LITERATUR.

- Aronsohn, Ed. und J. Sachs (1885): Pflügers Arch f. d. ges. Physiol. **37**, 232, 625.
- Fischer, E. und H. Kurzel (1883): Liebigs Ann. d. Chem., **221**, 282.
- Fränkel, S. (1921): Arzneimittelsynthese, 5. Aufl. 291.
- Gabriel, S. und J. Zimmermann (1879): Ber. d. Dtsch. Chem. Ges., **12**, 602.
- Sasaki, T. (1921): Ber. d. Dtsch. Chem. Ges., **54**, 163.
- Ueda, H. (1928): Ber. d. Dtsch. Chem. Ges., **61**, 140.



## THE EFFECT OF THE PRESENCE OF VARIOUS SALTS ON THE SURFACE TENSION OF SODIUM TAUROCHOLATE SOLUTION.

By

MOTOO ITOI.

*(From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University.  
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, April 1, 1930.)

### I. INTRODUCTORY.

The effect of the presence of salt on the surface tension of the watery solution containing a surface active substance has been studied by many investigators. Its systematic researches, however, were only limited to the investigation by Seith on aliphatic alcohol and aniline, that by Goard and Rideal on phenol, and that by Palitzsch on urethane.

Seith (1925) worked out the relation of the lowering of surface tension of the solution of alcohol and of aniline to varying concentrations of added electrolytes and subscribed the effect to the hydration of adding electrolytes.

Goard and Rideal (1925), studying the effect of the addition of sodium chloride on the surface tension of phenol solution, found that the adsorption of phenol is greatly increased by the presence of sodium salt forming finally an unimolecular layer, but that the surface tension of the solution is also strongly influenced by the character of the solution underlaying the surface film.

Palitzsch (1928) studied the effect of the addition of various salts on the surface tension of urethane and obtained the result that the mode of affection by salts is different according to the concentrations of urethane on the one hand, while on the other hand the nature of the salts also has a great influence upon it;

Namely, the effect of the concentration of salt is large when the solution of urethane is dilute, while it is annulled when the concentration of urethane is increased. From the certain degree of concentration of urethane the more concentrated the salt is, the less active becomes the surface activity of the solution. This result is what Seith has already found in case of alcohol and aniline.

That the nature of salts has a great difference upon the effect of surface activity of urethane solution is probably due to the same cause that has been elucidated also by Seith in the above study, i.e. by the difference of hydration of the various salts.

It is a well known fact that the bile salt solution exhibits an intensive surface activity. As far as the relation of surface activity to the concentration of the solution, Krajewsky & Wwedensky (1928) have determined that activity is already prominent in a very diluted concentration and that the maximal activity is reached when the concentration of taurocholate has approached 0.017 g-Mol/Liter. They found also the fact that at higher concentration than this the taurocholate solution becomes less surface active. Ettisch and Koganei (1928) have also found the maximum value of surface activity at a concentration less than 0.005 Mol of taurocholate solution.

E. Doumer and Ed. Doumer (1921) worked out the relation existing among the concentration of sodium glykocholate, that of sodium chloride and the degree of lowering of surface tension of the solution.

The above mentioned reports tell us that the bile salt is quite a surface active substance and the surface activity is increased by the presence of salt.

Ettisch and Koganei try to explain that the activity has a maximum value at a certain concentration of bile salt, by the assumption that the bile salt is hydrolysed in a dilute solution and sets free the bile acid which might have a higher activity than its salt. When the concentration of bile salt becomes more concentrated, the hydrolysis is suppressed and the surface which becomes

equipped only with molecules of bile salt is less active than the surface which has also molecules of free bile acid. The present study has aimed to get an exact knowledge of the influence of the addition of electrolytes upon the surface activity of bile salt solution and to present a precise explanation of it.

## II. METHOD AND MATERIALS.

The surface tension of the solution is determined by the method proposed by du Noüy. The diameter of the platin ring is about 13 mm. 5 cc. of the solution was placed in a clean watch glass of 4.6 cm width and the determination of activity was always taken after the lapse of 1 hour. The surface tension was expressed by a relative surface tension, which was got by multiplying with 100 the ratio of the reading taken for the solution to the reading for water at the same temperature. The room temperature varied between 20° and 28°.

The bile salt used was taurocholate Merck. As the prepareate was highly coloured it was purified as follows. The filtered saturated alcoholic solution was decolorized with animal charcoal and, after an addition of a small amount of water, was added with ether until the solution became turbid and was set aside. The material thus obtained was white crystal and its 1% watery solution was also entirely colourless.

All kinds of salts used in this experiment were obtained either from Kahlbaum or Merck. The stock solution of each salt was prepared in a concentration, the value of which amounted to just twice that of highest salt concentration in the final solution used. The lower solution was got by the dilution from this stock solution. In each experiment, 5 cc. of the bile salt solution was well mixed with 5 cc. of each of these salt solutions, and 5 cc. of this mixture used for the determination of surface tension, while the remaining solution was used for the estimation of pH value.

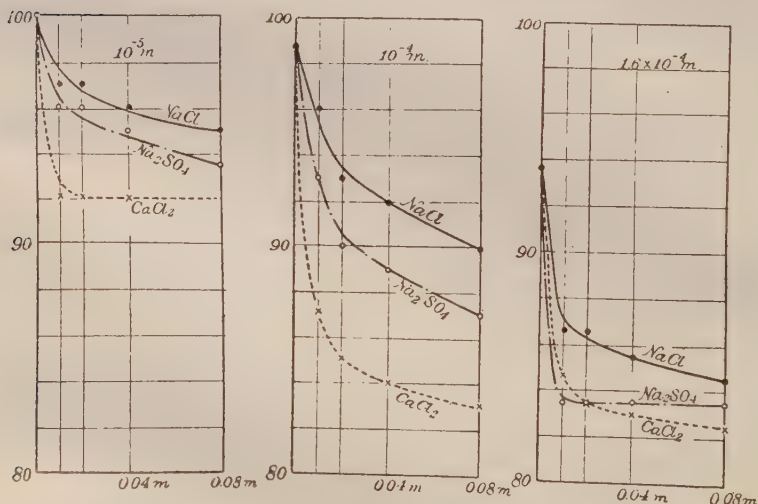
### III. CONDITIONS OF EXPERIMENTS.

#### 1. The concentration of taurocholate.

As the effect of the addition of electrolytes on the surface tension of bile salt solution is greatly influenced by the concentration of both solutes, the mode of the variation of the effect in the varying concentrations of electrolytes in the varying concentration of taurocholate solution was studied by following the change of surface tension of the solution obtained by the addition of various amounts of sodium and calcium salts in varying concentration of taurocholate solution. The effect of the addition of salts was small when the concentration of taurocholate is low, as the maximum effect, which does not amount to much, is soon obtained, while too high a concentration of taurocholate is itself highly surface active and is not further influenced much by the addition of sodium chloride. The most favourable concentration of tauro-

Fig. 1.

The effect of the addition of salts on the surface tension of taurocholate solution at varying concentrations.



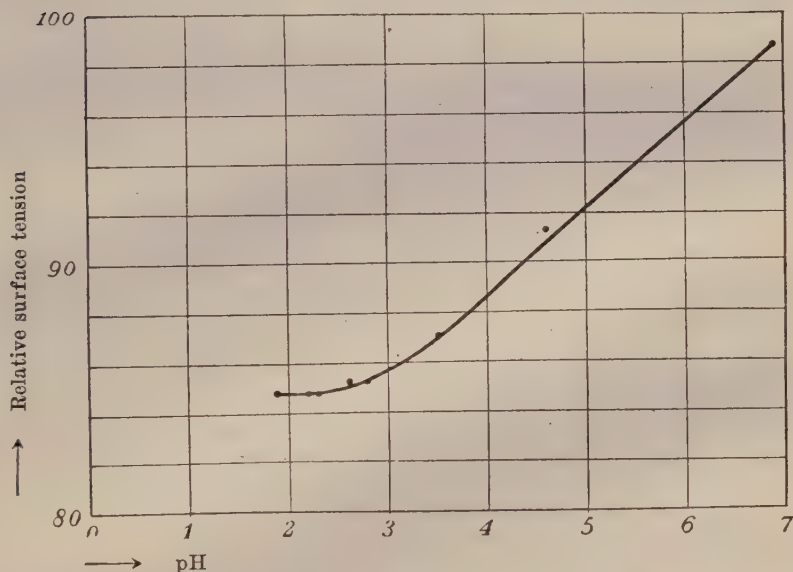
cholate seemed to lie at  $0.2-1 \times 10^{-4}$  Mol. The mode of effect for the different concentrations of taurocholate solution is illustrated in figure 1. In the following experiments, therefore, these two concentrations of taurocholate were chosen and the addition of various electrolytes was performed with these solutions.

## 2. pH value of the solution.

As the taurocholic acid, being an organic acid, is influenced by the acidity of the solution in its dissociation and salt formation, it may be highly necessary for the study of surface activity to experiment in a definite well chosen acidity. In figure 2 the rela-

Fig. 2.

The surface tension of taurocholate solutions at various acidity.



tion of acidity to the relative surface tension of 0.0001 mol. taurocholate solution is given. The different acidity was obtained by the gradual addition of the necessary quantity of hydrochloric acid and was determined by the colorimetric method.

As can be seen in the figure, the surface tension lowers with the decrease of pH value. This lowering of surface tension in increasing acidity is related, as is shown below with the liberation of free taurocholic acid and with the suppression of the dissociation. The effect of the addition of salt may also be influenced by the acidity of the medium, as the free taurocholic acid can hardly form its salt with different kinds of cations in medium far more acidic than corresponding to its isoelectric point. The isoelectric point of taurocholic acid can be presently assumed as pH 3.5, as will be reported by Shiono (1930).

To know how various kind of salts effect the surface tension of taurocholic acid, is, therefore, preferably learned by experiments at both the acidic and basic sides of this isoelectric point. In the following experiments two kinds of acidity were chosen, the one at pH 6.8 and the other at pH 3.0, each representing an acidity in one or the other side of isoelectric point.

#### IV. THE EFFECT OF VARIOUS SALTS WITH UNIVALENT ANION ON THE SURFACE TENSION OF SODIUM TAURO- CHOLATE SOLUTION.

The effect of various salts with univalent anion on the surface tension of sodium taurocholate solution was first studied. The salts used in this experiment were LiCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , NaCl,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{AlCl}_3$  and the concentration of salts added were varied among 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 and sometimes 2.0 mol. The acidity was pH 6.8 in one series of experiments, and pH 3.0 in the other. The result is given in Table I and Figure 3.

Each number is the average value of two sets of determination. These readings agreed very well.

We can observe from the table and figure the following facts:

1. In the solution at pH 6.8 the salts with cation of different chemical valency differ in the mode of effect. While salt with univalent cation like LiCl and NaCl lowers the surface tension of taurocholate in a relatively small amount, salts with bivalent action

TABLE I.

Relative surface tension of sodium taurocholate upon the addition  
of various salts.

Sodium taurocholate  $1 \times 10^{-4}$  mol.

pH	Kind Concentration	NaCl	LiCl	NH <sub>4</sub> Cl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	AlCl <sub>3</sub>
6.8	0.0313	91.3	93.0	92.1	85.6	87.0	80.8
	0.0625	91.3	91.5	90.4	85.2	86.0	80.8
	0.125	88.7	90.8	88.2	84.3	85.2	80.8
	0.25	87.4	88.7	87.0	82.6	84.0	80.8
	0.5	85.2	86.5	85.2	82.1	83.0	80.8
	1.0	83.0	83.4	84.0	81.7	81.3	79.5
	1.5	—	—	—	80.0	80.0	—
	2.0	79.1	81.7	80.8	—	—	—
	4.0	—	77.8	—	—	—	—
3.0	0.0313	84.8	84.3	85.6	84.3	84.0	82.6
	0.0625	84.3	84.3	84.8	84.0	83.4	82.1
	0.125	84.0	83.4	84.8	83.4	83.4	81.7
	0.25	82.6	83.0	84.0	83.0	82.6	81.3
	0.5	81.7	82.1	83.4	82.1	81.3	80.0
	1.0	79.5	80.8	80.8	80.0	80.0	79.1
	1.5	—	—	—	79.5	79.1	—
	2.0	77.0	79.1	80.4	—	—	—
	4.0	—	76.0	—	—	—	—

Sodium taurocholate  $2 \times 10^{-5}$  mol.

pH	Kind Concentration	NaCl	LiCl	NH <sub>4</sub> Cl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	AlCl <sub>3</sub>
6.8	0.0313	97.4	97.8	97.8	94.0	95.2	88.7
	0.0625	97.4	97.4	97.0	92.6	93.5	89.1
	0.125	96.5	96.5	96.0	92.1	93.5	90.0
	0.25	94.8	95.6	94.3	92.1	92.1	90.0
	0.5	93.0	92.1	93.5	91.3	90.8	90.0
	1.0	91.3	91.7	91.7	89.5	89.5	89.5
	1.5	—	—	—	89.5	89.5	—
	2.0	88.7	89.1	90.4	—	—	—
	4.0	—	85.2	—	—	—	—
3.0	0.0313	93.0	93.0	94.0	92.1	92.1	90.8
	0.0625	91.7	92.1	93.5	91.7	92.1	90.4
	0.125	91.3	91.7	93.0	90.8	90.8	90.4
	0.25	89.5	90.8	92.1	90.8	90.4	89.5
	0.5	89.1	90.8	91.7	90.4	90.4	88.7
	1.0	87.8	89.5	90.4	89.5	89.1	87.8
	1.5	—	—	—	89.5	88.2	—
	2.0	85.2	88.2	87.4	—	—	—
	4.0	—	84.3	—	—	—	—

Fig. 3a.  
Solution at pH 6.8

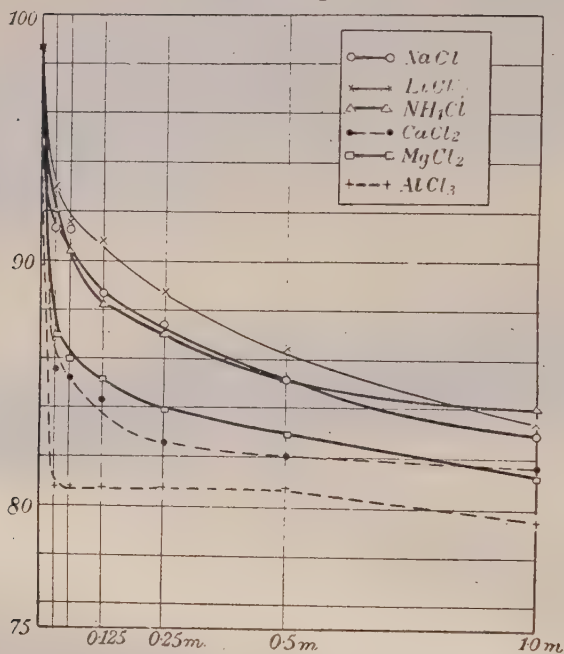
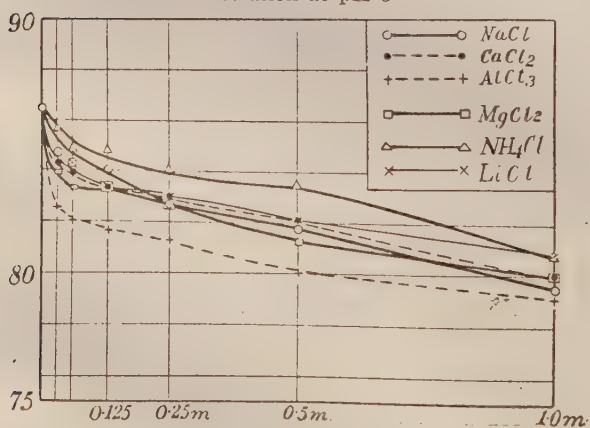


Fig. 3b.  
Solution at pH 3



like  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  lowers in a much greater extent and the effect is the greatest with  $\text{AlCl}_3$ . It should be mentioned that the pH value of the solution added with  $\text{AlCl}_3$  was much smaller than pH 6.8, and that the surface activity in this case, therefore, is not the effect of  $\text{AlCl}_3$  alone, but also represents the influence of acidity increase caused by the hydrolysis of that salt. The course of decreasing surface tension with the salt concentration added almost resembles each other among salts with anion of the same valency.

2. In the solution at pH 3.0, the differences among salts with cations of different valency almost vanish, and the course of change in surface tension with increasing salt concentration takes nearly the same form.

This relation is more fully shown by experiments with various kinds of nitrates. Nitrate of potassium, silver, copper and lanthanum were added in increasing amount to the sodium taurocholate solution and the surface tension measured with these mixtures. The result, which perfectly coincides with the above statement, is shown in table II and figure 4.

TABLE II.

Relative surface tension of sodium taurocholate upon the addition of various salts.

Sodium taurocholate  $1 \times 10^{-4}$  mol.

pH	Kind Concentration	La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>				
		KNO <sub>3</sub>	AgNO <sub>3</sub>	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	pH	r.s.t
6.8	0.0064	—	—	—	4.0	81.7
	0.0128	—	—	—	3.8	81.3
	0.0257	—	—	—	3.5	82.1
	0.0313	93.0	88.7	82.6	—	—
	0.0514	—	—	—	3.4	82.1
	0.0625	90.8	87.0	82.6	—	—
	0.1028	—	—	—	3.0	83.0
	0.125	89.5	85.6	83.4	—	—
	0.2137	—	—	—	2.4	83.4
	0.25	87.4	85.2	83.4	—	—
	0.4275	—	—	—	2.0	83.0
	0.5	87.0	85.2	84.3	—	—
	0.855	—	—	—	1.6	80.8
	1.0	85.2	85.2	84.8	—	—

3.0	0.0064	—	—	—	3.0	83.4
	0.0128	—	—	—	3.0	83.0
	0.0257	—	—	—	3.0	83.0
	0.0313	84.0	84.8	84.3	—	—
	0.0514	—	—	—	3.0	83.4
	0.0625	84.0	84.3	84.3	—	—
	0.1028	—	—	—	3.0	83.4
	0.125	83.4	84.0	84.0	—	—
	0.2137	—	—	—	2.3	83.4
	0.25	83.4	84.0	84.0	—	—
	0.4275	—	—	—	1.9	84.0
	0.5	83.0	83.4	85.2	—	—
	0.855	—	—	—	1.6	81.7
	1.0	82.1	85.6	86.0	—	—

Sodium taurocholate  $2 \times 10^{-5}$  mol.

pH	Kind Concen- tration	KNO <sub>3</sub>	AgNO <sub>3</sub>	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	
					pH	r.s.t
6.8	0.0064	—	—	—	4.0	90.4
	0.0128	—	—	—	3.8	90.4
	0.0257	—	—	—	3.5	90.8
	0.0313	98.2	96.5	91.3	—	—
	0.0514	—	—	—	3.4	91.3
	0.0625	97.0	94.8	91.3	—	—
	0.1028	—	—	—	3.0	91.3
	0.125	96.0	94.3	91.7	—	—
	0.2137	—	—	—	2.4	90.8
	0.25	95.6	94.0	92.1	—	—
	0.4275	—	—	—	2.0	89.1
	0.5	94.3	94.0	92.6	—	—
3.0	0.855	—	—	—	1.6	84.3
	1.0	93.0	94.0	93.0	—	—
	0.0064	—	—	—	3.0	91.7
	0.0128	—	—	—	3.0	91.3
	0.0257	—	—	—	3.0	61.7
	0.0313	92.6	92.6	92.6	—	—
	0.0514	—	—	—	3.0	91.7
	0.0625	92.1	92.6	92.1	—	—
	0.1028	—	—	—	3.0	91.3
	0.125	92.1	92.6	91.7	—	—
	0.2137	—	—	—	2.3	91.3
	0.25	91.7	92.6	92.1	—	—
	0.4275	—	—	—	1.9	90.0
	0.5	91.7	93.5	93.0	—	—
	0.855	—	—	—	1.6	85.6
	1.0	90.8	93.5	93.5	—	—

Fig. 4a.  
Solution at pH 6.8

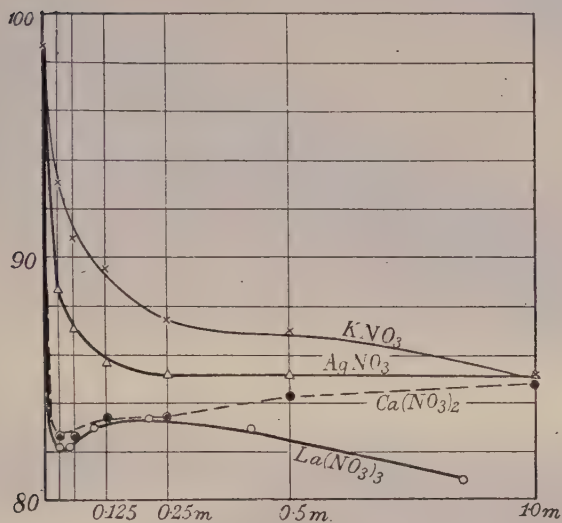
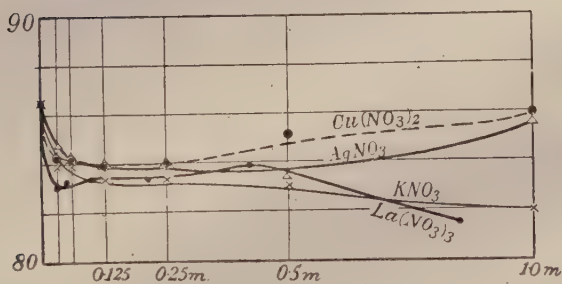


Fig. 4b.  
Solution at pH 3



Although, by the addition of lanthanum nitrate, the acidity of the solution tends to increase, as is shown in table II, the lowering of surface tension due to the change in the acidity as shown in figure 2 is far less, and especially in the lower concentration the effect of the addition of lanthanum salt is obviously clear.

V. THE EFFECT OF VARIOUS SALTS WITH UNIVALENT CATION  
ON THE SURFACE TENSION OF SODIUM TAUROCHOLATE  
SOLUTION.

In this experiment the effects of various sodium or potassium salts were studied. The salts used were NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , NaOx, Na-Citrat and  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  and both the range of salt concentration and acidity of the solution remained the same as in the preceding experiment. The result is given in Table III and Figure 5.

In Figure 5*b* only the curves for NaCl and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  are placed, and the other salts which change the acidity of the solution, were dismissed.

From these numbers and figure we can deduce the following conclusions:

1. In the solution at pH 6.8 the salts made of some univalent cation and anions of various different valency caused almost the same effect on the surface tension of taurocholate when the concentrations of the salt added were small. With increasing concentrations, however, such a divergency of the course is observed that the chloride effect is least and salt with polyvalent ions like ferrocyanide and citrate the most, while divalent sulphate comes in the middle.

2. In the solution at pH 3.0 the effect of the addition of sodium chloride and sodium sulfate was almost of the same nature as at pH 6.8, the only difference being the surface activity at the higher H-ion concentration greater for a certain amount than at the lower H-ion concentration.

VI. THE CONSIDERATION ON THE NATURE OF EFFECT OF THE  
ADDITION OF SALT ON THE SURFACE TENSION OF  
TAUROCHOLATE SOLUTION.

A glance at the results obtained in this and the foregoing section suggests to us the nature of the effect of the salt addition on

TABLE III.

Relative surface tension of sodium taurocholate upon the addition of various salts.

Sodium taurocholate  $1 \times 10^{-4}$  mol.

pH	Kind Concentration	NaCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na-OX	Na-Citrat	K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
6.8	0.0313	91.3	91.3	90.4	88.7	89.5
	0.0625	91.3	89.1	88.2	87.8	87.4
	0.125	88.7	88.2	85.6	84.3	85.6
	0.25	87.4	85.2	81.7	82.1	81.7
	0.5	85.2	81.7	—	77.0	76.0
	1.0	83.0	75.2	—	70.8	—
	1.5	—	—	—	65.6	—
	2.0	79.1	—	—	—	—
3.0	0.0313	84.8	84.8	—	—	—
	0.0625	84.3	84.3	—	—	—
	0.125	84.0	82.6	—	—	—
	0.25	82.6	81.3	—	—	—
	0.5	81.7	78.7	—	—	—
	1.0	79.5	72.6	—	—	—
	1.5	—	—	—	—	—
	2.0	77.0	—	—	—	—

Sodium taurocholate  $2 \times 10^{-5}$  mol.

pH	Kind Concentration	NaCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na-OX	Na-Citrat	K Fe(CN) <sub>6</sub>
6.8	0.0313	97.4	97.0	95.6	96.0	95.6
	0.0625	97.4	96.0	94.8	92.6	95.2
	0.125	96.5	94.0	93.0	91.3	93.0
	0.25	94.8	91.7	89.5	89.5	90.0
	0.5	93.0	89.1	—	86.0	84.3
	1.0	91.3	84.0	—	79.1	—
	1.5	—	—	—	72.5	—
	2.0	88.7	—	—	—	—
3.0	0.0313	93.0	91.3	—	—	—
	0.0625	91.7	90.3	—	—	—
	0.125	91.3	90.4	—	—	—
	0.25	89.5	89.1	—	—	—
	0.5	89.1	86.0	—	—	—
	1.0	87.8	82.1	—	—	—
	1.5	—	—	—	—	—
	2.0	85.2	—	—	—	—

Fig. 5a.  
Solution of pH 6.8

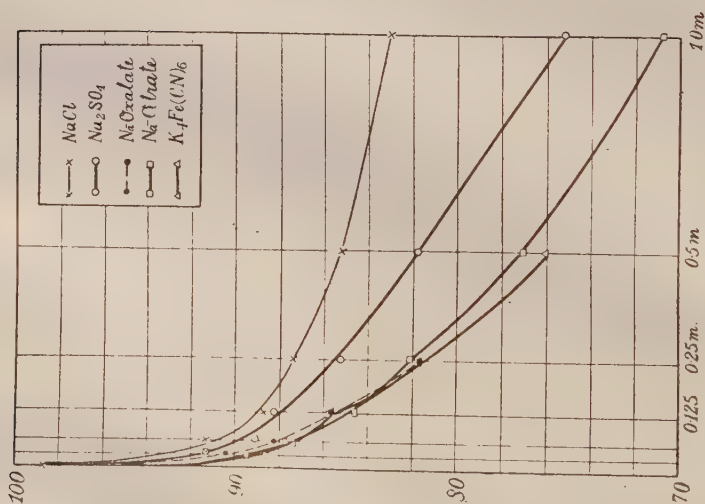


Fig. 5b.  
Solution at pH 3

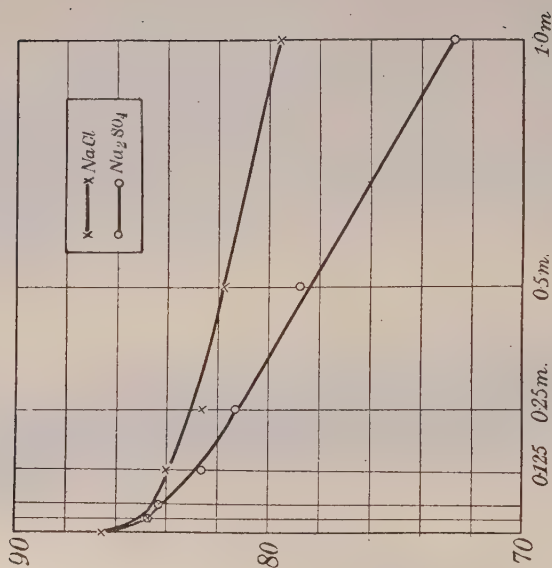


TABLE IV.

Relative surface tension of sodium taurocholate upon the addition of various salts.

Sodium taurocholate  $1 \times 10^{-4}$  mol.

pH	Kind Concen- tration	KCl	KBr	KNO <sub>3</sub>	KI	KCNS
6.8	0.0313	91.7	92.6	93.0	92.6	91.7
	0.0625	90.4	91.3	90.8	90.8	90.8
	0.125	88.7	89.1	89.5	89.1	88.7
	0.25	87.0	87.4	87.4	87.8	87.0
	0.5	85.2	85.6	87.0	86.5	87.0
	1.0	83.4	84.0	85.2	86.5	86.5
	1.5	81.7	83.4	—	86.0	—
	2.0	—	—	—	—	86.0
3.0	0.0313	84.8	84.8	84.0	84.0	84.8
	0.0625	84.8	83.0	84.0	84.0	84.8
	0.125	83.4	83.0	83.4	83.4	84.3
	0.25	82.6	83.0	83.4	82.6	84.3
	0.5	82.1	82.6	83.0	82.6	84.3
	1.0	80.4	81.3	82.1	83.4	85.2
	1.5	78.7	78.8	—	82.3	—
	2.0	—	—	—	—	84.8

Sodium taurocholate  $2 \times 10^{-5}$  mol.

pH	Kind Concen- tration	KCl	KBr	KNO <sub>3</sub>	KI	KCNS
6.8	0.0313	97.8	97.4	98.2	98.2	96.5
	0.0625	97.0	97.0	97.0	96.5	95.6
	0.125	96.0	95.6	96.0	96.0	95.2
	0.25	94.8	94.8	95.6	95.6	94.8
	0.5	93.5	93.0	94.3	94.8	94.3
	1.0	91.7	93.0	93.0	93.0	94.3
	1.5	90.4	91.7	—	93.0	—
	2.0	—	—	—	—	94.0
3.0	0.0313	92.6	93.0	92.6	92.1	93.0
	0.0625	92.1	91.3	92.1	90.8	92.6
	0.125	90.8	91.3	92.1	90.4	92.1
	0.25	90.8	91.3	91.7	89.5	91.7
	0.5	89.5	90.4	91.7	90.0	91.7
	1.0	88.2	87.0	90.8	90.4	93.0
	1.5	87.0	84.9	—	89.2	—
	2.0	—	—	—	—	92.1

the surface tension of taurocholate solution. Whereas cations having a higher valency affect the surface tension of taurocholate only when the hydrogenion concentration of the solution is lower than the isoelectric point of taurocholic acid, the effects of anions with different valency remain always the same, whether the reaction of the solution is acidic or alkaline. The mode of effect of

Fig. 6a.  
Solution at pH 6.8

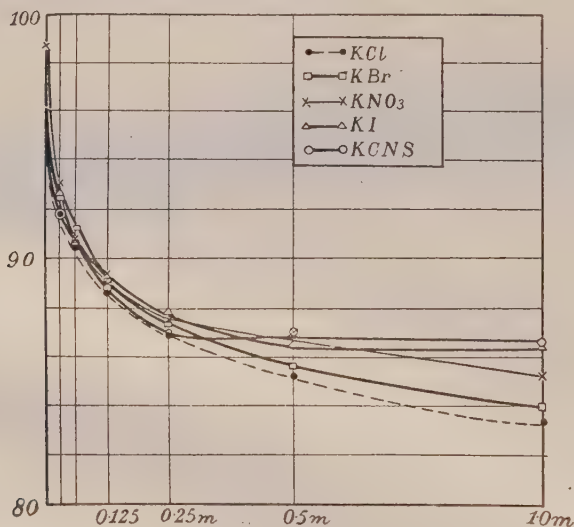
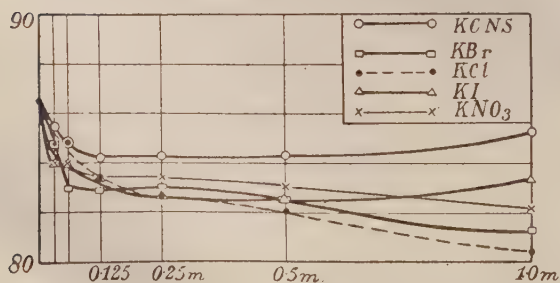


Fig. 6b.  
Solution at pH<sub>3</sub>



cations on the surface tension of taurocholate is extensively studied by Dr. Shiono in this laboratory and will be reported shortly.

As to the effect of anions on surface tension the effect of potassium salts of various univalent anions was studied, the salts used being chloride, bromide, nitrate, iodide and thiocyanate. As is shown in table IV and figure 6, the order of effectiveness among them is as follows, the most effective one coming first: Chloride, bromide, nitrate, iodine, thiocyanate.

This result, together with the difference shown among the effects of anions with different valencies, as given under section V, is perfectly conceived from the consideration that salts in higher concentration deprive a larger amount of the water molecule from the solution and the taurocholate becomes more concentrated than its analytical concentration. The order of effectiveness on the lowering of the surface tension of the taurocholate solution agrees quite well with the degree of hydration of respective electrolytes.

#### VII. THE SURFACE TENSION OF TAUROCHOLIC ACID AND THE EFFECT OF THE ADDITION OF HYDROCHLORIC ACID UPON IT.

To elucidate the nature of surface tension of taurocholate solution, it seems to be necessary, first to compare the surface tension of taurocholate solution with that of taurocholic acid. I have measured therefore the surface tension of both taurocholate and taurocholic acid solutions of different concentrations. The results are given in Table V and Fig. 7.

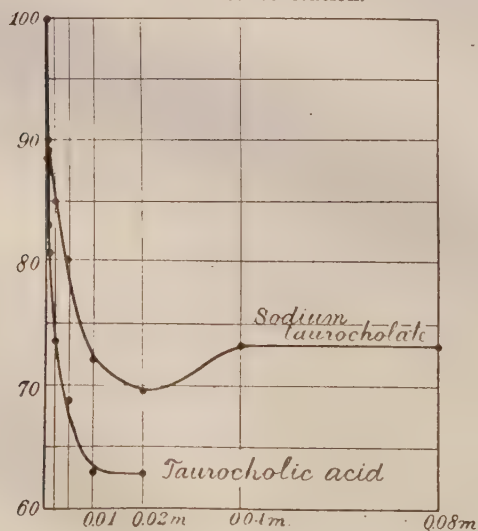
As will be seen from the table and figure, the surface tension of both taurocholate and taurocholic acid solution decreases at first with the concentration. In the case of sodium taurocholate solution, however, there is a minimum observable in the neighbourhood of 0.02 mol to increase again up to 0.04 mol, after which the surface tension shows a constant value. On the other hand, taurocholic acid showed no minimum value and reaches a constant value at 0.01 mol. The surface tension is far less in taurocholic acid solution

TABLE V.  
Relative surface tension of sodium taurocholate & taurocholic acid.

Concentration \ Kind	Sodium taurocholate	taurocholic acid.
0.08	73.0	—
0.04	73.0	—
0.02	69.5	62.6
0.01	72.1	62.6
0.005	80.0	68.6
0.0025	84.5	73.0
0.00125	89.2	80.2
0.000625	93.1	82.8
0.000313	96.1	89.2
0.000156	98.3	93.5
0.000078	99.1	96.5
0.000039	99.5	98.7
0.000020	100	98.7
0.000010	—	99.1
0.000005	—	99.1
0.0000025	—	99.5
0.00000125	—	100

Fig. 7.

The surface tension of taurocholic acid and sodium taurocholate solution at different concentration.



than in the case of taurocholate solution. This minimum value may come from the fact that the surface tension of taurocholate solution is due partly to the free taurocholic acid produced by the hydrolysis of taurocholate in a dilute solution and partly to undissociated taurocholate molecule, the minimum point indicating the concentration where hydrolysis is not totally suppressed and where the surface layer is tightly covered with taurocholic acid and taurocholate molecules. This is quite conceivable as the taurocholic acid is far more surface active than its salt, as is seen in the table and figure.

The above view is supported by the following two experiments.

1. *The change in the surface tension of taurocholic acid solution upon the addition of hydrochloric acid.* A series of 0.005 mol. taurocholic acid solution, the surface tension of which is much larger than the minimum value observed at about 0.01 mol solution, were prepared with an increased amount of added hydrochloric acid, and the change of surface tension by the addition of hydrochloric acid was followed. If the surface tension of taurocholic acid is due to the presence of taurocholic acid molecules in the surface layer and if the parts of taurocholic acid are dissociated and distributed throughout within the solution, the addition of hydrochloric acid, which suppresses the dissociation of the taurocholic acid and will increase the number of undissociated molecules in the surface layer, induces the lowering of the surface tension accordingly. The results of the experiment exactly bear out this supposition.

Table VI and figure 8 indicate that the surface tension of 0.005 m taurocholic acid solution is lowered steadily with the addition of increasing amount of hydrochloric acid and finally reaches the same value which is the minimum surface tension of concentrated taurocholic acid solution.

2. *The change of the surface tension of sodium taurocholate solution upon the addition of sodium hydroxide.*

A series of 0.006 mol. sodium taurocholate solution were pre-

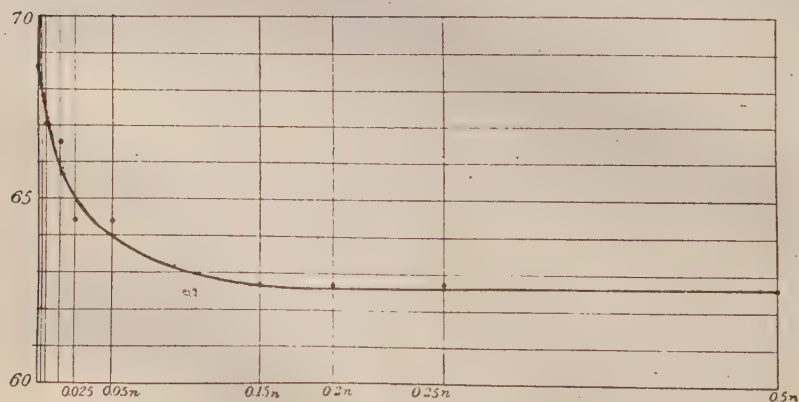
TABLE VI.

Relative surface tension of 0.005 mol taurocholic acid upon the addition of hydrochloric acid.

End concentration of hydrochloric acid	Relative surface tension
0	68.6
0.0025	67.8
0.005	67.0
0.015	66.5
0.025	64.4
0.05	64.4
0.15	62.6
0.20	62.6
0.25	62.6
0.5	62.6

Fig. 8.

Surface tension of 0.005 mol taurocholic acid upon the addition of hydrochloric acid.



pared with the increasing amount of added sodium hydroxide and the change of surface tension of sodium taurocholate solution by the addition of sodium hydroxide was followed. If the surface tension of sodium taurocholate solution is due partly to the presence of free taurocholic acid molecule produced by the hydrolysis of taurocholate and partly to the presence of taurocholate molecule as we have supposed above, the natural sequence of the addition of sodium hydroxide to the sodium taurocholate solution will be the suppression of hydrolysis of the taurocholate. As the free taurocholic acid molecule decreases by the suppression of a degree of hydrolysis with the addition of sodium hydroxide, the surface tension tends to increase. From a certain point, however, the dissociation of sodium taurocholate begins to decrease by the increase of sodium ion in the solution and the result is the increase of unionized molecules of sodium taurocholate in the surface layer, lowering thus again the surface tension of the solution. The result of this experiment, which is shown in table VII and figure 9, clearly indicate that what is said really occurs. The hydrolysis of sodium taurocholate is suppressed with the small amount of sodium hydroxide accompanied by the elevation of surface tension, while the further addition of sodium hydroxide suppresses the dissociation of sodium taurocholate quite slowly with the gradual lowering of the surface tension.

#### VIII. SUMMARY.

1. At pH 6.8, the surface tension of taurocholate solution is affected by the addition of a relative small amount of salt of various kinds. The effect is the greatest in salt with trivalent cation as  $\text{AlCl}_3$  and lanthamum nitrate and the least in salt with univalent cation like  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaCl}$  and  $\text{KNO}_3$ , while  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  come between. At pH 3 the differences among salts with cation of different valencies almost vanish.

2. The effect of the further addition of various salts depends largely on the nature of respective anions. Ferrocyanide affects

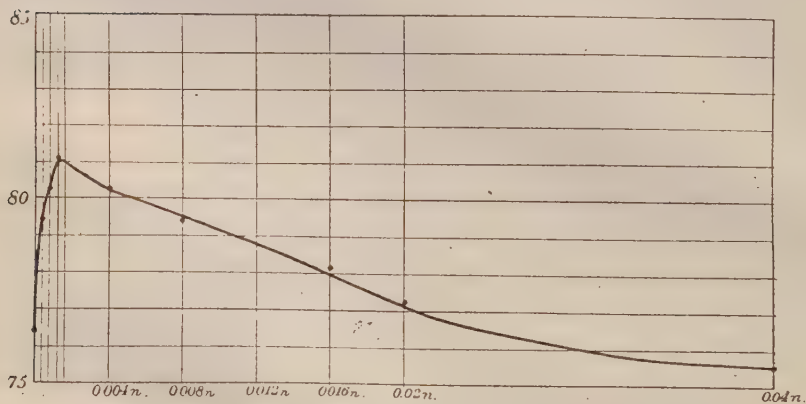
TABLE VII.

Relative surface tension of 0.006 mol Sodium taurocholate solution  
upon the addition of sodium hydroxide.

End concentration of Sodium hydroxide	Relative surface tension
0	76.4
0.0004 mol.	79.4
0.0008	80.2
0.0012	81.1
0.004	80.2
0.008	79.4
0.016	78.1
0.02	77.2
0.04	75.5

Fig. 9.

Surface tension of 0.006 mol Sodium taurocholate solution  
upon the addition of sodium hydroxide



far more than sulphate and the latter far more than salt with univalent anions. Hofmeister's lyotropic series is clearly observed among various kinds of anions. This kind of effect is observed throughout all range of acidity.

3. The surface tension of sodium taurocholate solution is due partly to the presence of free taurocholic acid derived by the hydrolysis of the taurocholate and partly to the presence of undissociated taurocholate molecules.

4. If the dissociation of the taurocholic acid, the surface tension of which does not reach the minimum value, is suppressed by the addition of hydrochloric acid, the surface tension of taurocholic acid decreases until the whole surface is covered with monomolecular layer of taurocholic acid, when the surface tension takes a minimum value.

5. The addition of a small amount of sodium hydroxide to the sodium taurocholate solution elevates the surface tension of the latter by the suppression of the hydrolysis of the salt, while the further addition of sodium hydroxide lowers again the surface tension of the solution, increasing the amount of undissociated taurocholate molecules.

I wish to express my sincere thanks to Prof. S. Kakiuchi for his kind advice throughout the course of the investigation.

#### REFERENCES.

- Doumer, E. and Doumer, Ed. (1921): *C. r. Soc. de biol.*, **84**, 595.  
Ettisch, G. and Koganci, R. (1928): *Biochem. Zeitschr.*, **193**, 390.  
Goard, A. K. and Rideal, E. K. (1925): *J. of Chem. Soc. London*, **127**, 1668.  
Krajewsky, N. A. and Wwedensky, N. (1928): *Biochem. Zeitschr.*, **191**, 241.  
Palitzsch, S. (1928): *Zeitschr. f. physik. Chem.*, **138**, 411.  
Seith, W. (1925): *Zeitschr. f. physik. Chem.*, **117**, 257.  
Shiono, M. (1930): The next number of this journal.



## ÜBER DIE HYDROLYSE DER BENZOYLDERIVATE DER AMINOSÄUREN DURCH DAS HISTOZYM.

VON

TAKEHIKO SO.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie  
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 12. April 1930.)

Im Jahre 1881 hat O. Schmiedeberg gefunden, dass die Nierenzellen des Schweins ein Hippursäure in ihre Komponenten zerlegendes Endoenzym, das Histozym, enthalten. Seit dieser Entdeckung sind die Benzoylderivate der Aminosäuren bisweilen zum Gegenstand der biochemischen Studien gewählt worden. Bis heute ist schon bekannt, dass ausser dem Benzoylderivate des Glykokolls auch das der anderen Aminosäuren, z.B. des  $\alpha$ -Alanins (N. Mutch, 1912), der *d*- $\alpha$ -Aminobuttersäure, des *l*-Leucins (J. A. Smorodinzew, 1923), *l*-Tyrosins und *l*-Cystins (S. Tamura, 1924), durch dieses Histozym hydrolysiert wird.

In der letzten Zeit hat das Studium der proteolytischen Fermente schnelle Fortschritte gemacht, und dadurch wurde die Existenz einer ziemlich strengen Spezifität für verschiedene proteolytische Fermente nachgewiesen. Ferner wird neuerdings behauptet, dass diese Spezifität der Fermente nicht allein von der Kompliziertheit des Moleküls des Substrates, sondern auch von den Arten der Aminosäuren beziehungsweise ihrem chemischen Bau abhängig ist.

Es ist also nicht unwahrscheinlich zu denken, dass auch die benzozylierten Aminosäuren ein verschiedenes Verhalten gegen das sogenannte Histozym je nach der Art der Aminosäure zeigen würden. Um diese Frage zu lösen, wurden die folgenden Experimente unternommen.

Die zu den Experimenten gebrauchten Benzoylamino-säuren

waren Hippursäure, Benzoylalanin, Benzoylasparaginsäure, Benzoylglutaminsäure, Benzoylalanin, Benzoylasparaginsäure, Benzoylglutaminsäure, Benzoylasparagin, Ornithursäure, Benzamid, Mono- und Dibenzoyl-*l*-Tyrosin. Auch die Phenacetursäure diente als Substrat. Die Hippursäure war von Kahlbaum; der grösste Teil der übrigen Säuren wurde nach E. Fischer synthetisch dargestellt, die Ornithursäure nach M. Jaffe aus den frischen Exkrementen mit benzoesaurem Natrium gefütterter Hühner gewonnen. Das Monobenzoyl-*l*-Tyrosin wurde in folgender Weise dargestellt: Zu der Chloroformlösung des *l*-Tyrosinäthylesters wurde das auch in Chloroform gelöste Benzoylchlorid unter Schütteln zugefügt. Das Chloroform wurde dann von der geringen, dabei entstandenen flockigen Masse geschieden und auf dem Wasserbad stark abgedampft; darauf wurde der Monobenzoyl-*l*-Tyrosinäthylester durch Petroläther gefällt. Durch Verseifung dieses Esters erhaltenes Monobenzoyl-*l*-Tyrosin wurde in der ca. 20 fachen Menge siedenden Wassers gelöst und daraus umkrystallisiert. Die Ausbeute war 71% der Theorie. Der N-Gehalt wurde bei 100°C getrockneter Substanz als 4,82% (berechnet 4,91%) gefunden. Dass sich die Benzoylgruppe desselben mit der Aminogruppe des Tyrosins verbindet, wurde durch das Van Slyke'sche Verfahren bestätigt.

Die gebrauchten Fermentpräparate wurden aus Nieren, Lebern und Skelettmuskeln von Schweinen, Hunden und Hühnern dargestellt. Die Organe wurden in frischem Zustande tunlichst von Fett und Gewebe befreit und mehrmals mit der Fleischmaschine zerkleinert. Der Organbrei wurde dann in einer Reibschale mit Aceton umgerührt und in einer Flasche geschüttelt. Nach ca. 2 stündigem Stehenlassen wurde er abfiltriert, der Filtrerrückstand dann wieder mit Aceton, dann mit Aceton-Äthergemisch geschüttelt, und schliesslich 2 mal mit Äther gewaschen. Nun wurde das pulvrige Material auf dem Filterpapier ausgebreitet und an der Luft getrocknet. Das lufttrockene Pulver wurde dann aufs feinste gemahlen und durchgeseiht.

Die Benzoylaminosäuren, abgesehen von der Ornithursäure, wurden in M/10 Natriumsalzlösung verwandelt. Die Ornithursäure selbst kam als M/20 Natriumsalzlösung in Gebrauch. Das Benzamid wurde in 20%igem Alkohol gelöst, und damit bereitete ich die 1/10 molare Lösung desselben.

Eine bestimmte Menge dieser Lösungen wurde in einem ca. 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben abpipettiert, dann mit einer bestimmten Menge Organpulver und M/10 Phosphatgemisch versetzt. Nach Thymolzusatz wurde das Gefäß gut verschlossen und 24 Stunden lang (wenn nötig 48 Stunden lang) in dem Thermostaten bei 37°C stehen gelassen.

Durch Fermentation freigemachte Aminogruppen wurden dann nach Linderström-Lang titrimetrisch bestimmt.

Gleichzeitig und in gleicher Weise wurde der Kontrollversuch ausgeführt. Die Kontroll-Lösung war aus destilliertem Wasser, Organpulver, M/10 Phosphatgemisch, sowie einer kleinen Menge Thymol zusammengesetzt. Der Moment der Zubereitung der Versuchs- und Kontroll-Lösung wurde als Null-Stunde angesehen. Ich zog den durch Kontrollversuch gewonnenen Wert von dem des Hauptversuches ab, und berechnete daraus die Prozente der durch Histozytm herbeigeführten Hydrolyse.

#### I. DIE ABHÄNGIGKEIT DER HISTOZYMWIRKUNG VON DER WASSERSTOFFZAHL.

Soviel ich weiss, ist die Ph-Abhängigkeit der Histozymwirkung bisher nur wenig studiert. H. Kimura (1928) hat bei den Versuchen mit der Niere, der Leber und dem Pankreas des Schweins gefunden, dass die optimale Wasserstoffionenkonzentration des Hippursäure spaltenden Fermentes zwischen Ph 6,4–Ph 7,2 liegt. Ich habe mit dem Präparate aus den Schweinenieren auch den Einfluss der Wasserstoffzahl auf die Wirkung des Histozyms untersucht und die folgenden Resultate erhalten.

Die Versuchsanordnung war wie folgt.

## Versuchslösung:

M/10 Natriumsalzlösung der Benzoylaminosäuren	7,5 cem.
Pulverisierte Schweinenieren	0,2 g.
M/10 Phosphatgemisch	2,5 cem.

## Kontroll-Lösung:

Dest. Wasser	7,5 cem.
Pulverisierte Schweinenieren	0,2 g.
M/10 Phosphatgemisch	2,5 cem.

Die Pufferlösungen wurden je nach dem Bedarf gemischt. Der Fäulnis der beiden Lösungen wurde durch Thymolzusatz vorgebeugt, und nach 24 stündigem Aufenthalt im Brutofen von 37°C wurde die Zunahme der freien Aminogruppen geprüft. Ph wurde elektrometrisch bestimmt.

TABELLE I.

## Hippursäure.

7,5 cem M/10 Natriumsalzlösung der Hippursäure verbrauchten  
bei Titration 7,51 cem n/10 HCl.

Ph	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- Versuch in cem. (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem. (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
5,6	0	7,49	0,78	10,3
	24	8,27		
6,4	0	7,50	1,29	17,1
	24	8,79		
6,8	0	7,49	1,31	17,4
	24	8,80		
7,0	0	7,48	1,28	17,0
	24	8,76		
7,7	0	7,50	1,28	17,0
	24	8,78		

TABELLE II.  
Benzoylalanin.7,5 ccm M/10 Natriumsalzlösung des Benzoylalanins verbrauchen  
bei Titration 7,39 ccm n/10 HCl.

Ph	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- Versuch in ccm. (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in ccm. (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
5,6	0	7,40	0,53	7,1
	24	7,93		
6,4	0	7,40	0,65	8,7
	24	8,05		
6,8	0	7,38	1,16	15,6
	24	8,54		
7,0	0	7,42	1,23	16,6
	24	8,65		
7,7	0	7,40	1,00	13,5
	24	8,40		

TABELLE III.  
Benzoylasparagin.7,5 ccm M/10 Natriumsalzlösung des Benzoylasparagins verbrauchen  
bei Titration 7,46 ccm n/10 HCl.

Ph	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- Versuch in ccm. (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in ccm. (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
5,6	0	7,44	0,35	4,6
	24	7,79		
6,4	0	7,43	0,82	10,9
	24	8,25		
6,8	0	7,44	1,07	14,3
	24	8,51		
7,0	0	7,45	1,09	14,6
	24	8,54		
7,7	0	7,44	0,38	5,0
	24	7,82		

TABELLE IV.

Monobenzoyl-*l*-Tyrosin.

7,5 cem M/10 Natriumsalzlösung des Monobenzoyl-*l*-Tyrosins verbrauchten  
bei Titration 7,47 cem n/10 HCl.

Ph	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- Versuch in cem. (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem. (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
5,8	0	7,48	2,15	28,7
	24	9,63		
6,5	0	7,50	2,23	29,8
	24	9,73		
6,8	0	7,50	2,33	31,2
	24	9,83		
7,0	0	7,50	2,50	33,4
	24	10,00		
7,7	0	7,50	2,31	30,9
	24	9,81		

TABELLE V.

## Phenacetursäure.

7,5 cem M/10 Natriumsalzlösung der Phenacetursäure verbrauchten  
bei Titration 7,40 n/10 HCl.

Ph	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- Versuch in cem. (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem. (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
5,7	0	7,36	0,35	4,7
	24	7,71		
6,5	0	7,35	0,48	6,4
	24	7,83		
6,8	0	7,36	0,85	11,4
	24	8,21		
7,0	0	7,34	0,83	11,2
	24	8,17		
7,6	0	7,34	0,52	7,0
	24	7,86		

Das Ph-Optimum des Histozyms war also bei Ph 6,8–7,0 vorhanden. Dieser Befund stimmt mit der Angabe von H. Kimura (1928) überein.

In gleicher Weise habe ich mit der Benzoylasparaginsäure, Benzoylglutaminsäure, dem Benzamide und Dibenzoyl-*l*-Tyrosin Versuche gemacht. Diese vier Benzoylverbindungen waren aber bei jeder der oben geschilderten Wasserstoffionenkonzentrationen durch das Histozym nicht hydrolysierbar.

## II. DIE WIRKUNG DES HISTOZYMS AUS VERSCHIEDENEN ORGANEN.

### A. Versuche mit Hippursäure, Benzoylalanin und Phenacetursäure.

Bei diesen Versuchen (auch bei den weiteren nachfolgenden) habe ich mich mit den Histozympräparaten aus Nieren, Lebern und Skelettmuskeln der Schweine, Hunde und Hühner beschäftigt.

Die Versuche wurden in folgender Anordnung angestellt, bei den gleichen Arbeitsmethoden wie früher:

#### Versuchslösung:

M/10 Natriumsalzlösung der Substrate	7,5 ccm.
Organpulver	0,2 g.
M/10 Phosphatgemisch von Ph 6,8	2,5 ccm.

#### Kontroll-Lösung:

Dest. Wassser	7,5 ccm.
Organpulver	0,2 g.
M/10 Phosphatgemisch von Ph 6,8	2,5 ccm.

Der Fäulnis der beiden Lösungen wurde wie früher durch Zusatz von Thymol vorgebeugt. Die erhaltenen Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Wie aus den Tabellen VI, VII und VIII ersichtlich ist, wurden das Benzoylglykokoll, Benzoylalanin und Phenacetylglykokoll von allen gebrauchten Organpräparaten gespalten.

TABELLE VI.

## Hippursäure.

7,5 cem M/10 Natriumsalzlösung der Hippursäure verbrauchten  
bei Titration 7,48 cem n/10 HCl.

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuchen in cem (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	7,44	1,22	16,4
	24	8,66		
Schweine- leber	0	7,44	0,35	4,6
	24	7,79		
Schweine- muskel	0	7,43	0,59	7,8
	24	8,02		
Hunde- niere	0	7,45	1,19	15,9
	24	8,64		
Hunde- leber	0	7,43	0,91	12,1
	24	8,34		
Hunde- muskel	0	7,46	0,33	4,4
	24	7,79		
Hühner- niere	0	7,46	1,49	19,9
	24	8,95		
Hühner- leber	0	7,45	0,37	4,9
	24	7,82		
Hühner- muskel	0	7,44	1,17	15,6
	24	8,61		

TABELLE VII.

## Benzoyl-Alanin.

7,5 cem M/10 Natriumsalzlösung des Benzoylalanins verbrauchten bei  
Titration 7,47 cem n/10 HCl.

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuch in cem (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	7,44	0,45	6,0
	24	7,89		
Schweine- leber	0	7,45	0,71	9,5
	24	8,16		
Schweine- muskel	0	7,44	0,35	4,7
	24	7,79		
Hunde- niere	0	7,44	0,43	5,7
	24	7,87		
Hunde- leber	0	7,45	0,26	3,5
	24	7,71		
Hunde- muskel	0	7,44	0,22	2,9
	24	7,66		
Hühner- niere	0	7,43	1,15	15,4
	24	8,60		
Hühner- leber	0	7,45	0,33	4,4
	24	7,78		
Hühner- muskel	0	7,43	0,26	3,5
	24	7,69		

## TABELLE VIII.

## Phenacetursäure.

7,5 ccm M/10 Natriumsalzlösung der Phenacetursäure verbrauchten bei  
Titration 7,48 ccm n/10 HCl.

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuch in ccm (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in ccm (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	7,45	0,62	8,3
	24	8,07		
Schweine- leber	0	7,44	1,19	15,9
	24	8,63		
Schweine- muskel	0	7,45	0,80	10,7
	24	8,25		
Hunde- niere	0	7,44	1,01	13,5
	24	8,45		
Hunde- leber	0	7,46	3,00	40,1
	24	10,46		
Hunde- muskel	0	7,47	2,97	39,7
	24	10,44		
Hühner- niere	0	7,44	3,22	43,0
	24	10,66		
Hühner- leber	0	7,44	3,10	41,4
	24	10,54		
Hühner- muskel	0	7,45	1,07	14,3
	24	8,52		

Bisher war schon bekannt, dass das *l*-Benzoylleucin, die *d*-*a*-Benzoylaminobuttersäure etc. von dem Histozyim angegriffen werden (J. A. Smorodinzew, 1923). Wenn man die oben geschilderten Ergebnisse der Experimente mit diesen Angaben vergleichend in Betracht nimmt, so könnte man daraus folgern, dass als Benzoylderivate der Monoaminomonocarbonsäuren durch das Histozyim leicht hydrolysiert werden.

*B. Versuche mit Benzoylasparaginsäure, Benzoylglutaminsäure und Benzamid.*

Die Experimente wurden ganz wie früher angestellt; die Resultate derselben sind in den nächststehenden Tabellen angegeben.

Die Benzoylasparagin- und Benzoylglutaminsäure wurden, wie aus der Tabelle IX und X erhellt, durch das Histozyim gar nicht gespalten. Gegen Benzamid waren auch alle gebrauchten Histozyimpräparate ganz wirkungslos. Das letztere ist aber bei neutraler Reaktion nicht wasserlöslich, deswegen mag es von diesem Fermente unbeeinflusst bleiben.

*C. Versuche mit Benzoylasparagin und Ornithursäure.*

Die Versuche mit Benzoylasparagin wurden ganz wie früher ausgeführt; die Ergebnisse sind in der Tabelle XII zusammengestellt.

Die Versuche mit Ornithursäure wurden in folgender Anordnung angestellt:

Versuchslösung:

M/20 Natriumsalzlösung der Ornithursäure 3,75 ccm.

Organpräparat 0,1 g.

M/10 Phosphatgemisch von Ph 6.8 1,25 ccm.

Kontroll-Lösung:

Dest. Wasser 3,75 ccm.

TABELLE IX.

## Benzoylasparaginsäure.

7,5 cem M/10 Natriumsalzlösung der Benzoylasparaginsäure verbrauchten  
bei Titration 14,88 cem.

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuch in cem (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	14,85	0,03	0
	24	14,88		
Schweine- leber	0	14,84	0,02	0
	24	14,86		
Schweine- muskel	0	14,85	0	0
	24	14,85		
Hunde- niere	0	14,82	0,03	0
	24	14,85		
Hunde- leber	0	14,84	0,02	0
	24	14,86		
Hunde- muskel	0	14,83	0	0
	24	14,82		
Hühner- niere	0	14,84	0	0
	24	14,84		
Hühner- leber	0	14,86	0	0
	24	14,84		
Hühner- muskel	0	14,83	0,02	0
	24	14,85		

TABELLE X.

## Benzoylglutaminsäure.

7,5 cem M/10 Natriumsalzlösung der Benzoylglutaminsäure verbrauchten  
bei Titration 14,77 cem n/10 HCl.

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuch in cem (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	14,73	0	0
	24	14,72		
Schweine- leber	0	14,75	0	0
	24	14,74		
Schweine- muskel	0	14,73	0	0
	24	14,73		
Hunde- niere	0	14,74	0	0
	24	14,73		
Hunde- leber	0	17,75	0	0
	24	14,73		
Hunde- muskel	0	14,75	0	0
	24	14,73		
Hühner- niere	0	14,74	0	0
	24	14,74		
Hühner- leber	0	14,75	0	0
	24	14,73		
Hühner- muskel	0	14,76	0	0
	24	14,73		

TABELLE XI.

## Benzamid.

7,5 cem M/10 Benzamidlösung verbrauchten bei Titration 0 cem  
n/10 HCl

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuch in cem (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	0	0	0
	24	0		
Schweine- leber	0	0	0	0
	24	0		
Schweine- muskel	0	0	0	0
	24	0		
Hunde- niere	0	0	0	0
	24	0		
Hunde- leber	0	0	0	0
	24	0		
Hunde- muskel	0	0	0	0
	24	0		
Hühner- niere	0	0	0	0
	24	0		
Hühner- leber	0	0	0	0
	24	0		
Hühner- muskel	0	0	0	0
	24	0		

Organpräparat	0,1 g.
M/10 Phosphatgemisch von Ph 6.8	1,25 ccm.

Nach 48 stündigem Stehenlassen im Thermostaten von 37°C wurde die Zunahme der freien Aminogruppen wie früher geprüft; die erhaltenen Resultate sind in der Tabelle XII zu sehen.

Das Benzoylasparagin, in dem die eine Karboxylgruppe der Asparaginsäure ins Säureamid verwandelt ist, wurde, wie aus der Tabelle XII ersichtlich ist, ausschliesslich von den Nierenpräparaten der Schweine, Hunde und Hühner hydrolysiert. Das Histozym von anderer Herkunft war gegen dieses Substrat ganz wirkungslos. Diese interessante Tatsache wurde auch bei den Versuchen mit dem Benzoylderivate einer Diaminomonocarbonsäure, nämlich des Ornithins, wahrgenommen. Die Zahlen sind in der Tabelle XIII angegeben.

Wenn man aus den Ergebnissen dieser drei Experimente folgert, so scheint die Benzoylmonoaminomonocarbonsäure gegen Fermente sich ganz anders zu verhalten als die Benzoylmonoamindicarbonsäure. Auch scheint das Benzoylmonoamindicarbonsäureamid in einer spezifischen Beziehung zu dem Fermente zu stehen und die Benzoyldiaminomonocarbonsäure könnte unter die letztere Gruppe gerechnet werden

#### *D. Versuche mit Mono- und Dibenzoyl-L-Tyrosin.*

Nun verliess ich die Benzoylderivate der aliphatischen Aminosäuren und arbeitete weiter mit dem benzoylierten Tyrosin, um das Verhalten des Histozyms gegen Benzoylverbindungen der aromatischen Aminosäuren zu studieren.

Neuerdings wurde durch die experimentellen Studien über die proteolytischen Fermente klar gemacht, dass sich die tyrosinhaltigen Peptide nicht selten gegen die Fermente spezifisch verhalten. Eine solche Erscheinung habe ich auch bei den Versuchen mit dem Monobenzoyl-L-Tyrosin nachgewiesen.

Die Versuche mit diesem Substrate wurden in derselben

TABELLE XII.

## Benzoylasparagin.

7,5 cem M/10 Natriumsalzlösung des Benzoylasparagins verbrauchten  
bei Titration 7,45 cem n/10 HCl.

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuch in cem (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	7,43	0,40	5,3
	24	7,83		
Schweine- leber	0	7,44	0,04	0
	24	7,48		
Schweine- muskel	0	7,42	0,03	0
	24	7,45		
Hunde- niere	0	7,43	1,03	13,8
	24	8,46		
Hunde- leber	0	7,43	0,03	0
	24	7,46		
Hunde- muskel	0	7,43	0,03	0
	24	7,46		
Hühner- niere	0	7,43	1,65	22,1
	24	9,08		
Hühner- leber	0	7,44	0,04	0
	24	7,48		
Hühner- muskel	0	7,44	0,02	0
	24	7,46		

TABELLE XIII.  
Ornithursäure.3,75 cem M/20 Natriumsalzlösung der Ornithursäure verbrauchten  
bei Titration 1,86 cem n/10 HCl.

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuch in cem (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	1,84	0,17	9,1
	48	2,01		
Schweine- leber	0	1,84	0	0
	48	1,84		
Schweine- muskul	0	1,84	0,01	0
	48	1,85		
Hunde- niere	0	1,84	0,18	9,6
	48	2,02		
Hunde- leber	0	1,84	0,01	0
	48	1,85		
Hunde- muskul	0	1,84	0,01	0
	48	1,85		
Hühner- niere	0	1,84	0,31	16,6
	48	2,15		
Hühner- leber	0	1,84	0,01	0
	48	1,85		
Hühner- muskul	0	1,84	0	0
	48	1,84		

Anordnung und Methode wie früher ausgeführt; die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Wie die Tabelle XIV zeigt, wurde das Monobenzoyl-*l*-Tyrosin ausschliesslich von dem Nierenpräparate des Schweins, und zwar in ziemlich hohem Grade, gespalten, während das Histozytm von anderer Herkunft auf dieses Substrat ohne Einfluss blieb.

Auch in diesem Punkte scheint das Monobenzoyl-*l*-Tyrosin eine spezifische Eigenschaft zu haben.

Ein Substrat, welches durch ein gewisses Ferment hydrolysierbar ist, gibt, wenn es sich mit einer chemischen Gruppe verbindet, nicht selten ein neues spezifisches Substrat. Dies ist eine Tatsache, die in der Fermentlehre häufig wahrgenommen wird. Als ein vorzügliches Beispiel dient die Benzoylasparaginsäure. Wie schon erwähnt, ist die Benzoylasparaginsäure durch die Nierenpräparate unangreifbar, während deren Säureamid, das Benzoylasparagin, von denselben ziemlich intensiv gespalten wird. Dasselbe Phänomen ist auch beim Monobenzoyl-*l*-Tyrosin zu sehen. Wenn man noch eine Benzoylgruppe an die Oxygruppe des Tyrosins bindet, so wird das dadurch entstandene Dibenzoyl-*l*-Tyrosin ein ganz anderes Substrat als Monobenzoyl-*l*-Tyrosin.

Die Versuche mit dem Dibenzoyl-*l*-Tyrosin wurden in folgender Anordnung angestellt:

Versuchslösung:

M/10 Natriumsalzlösung des Dibenzoyl-*l*-Tyrosins 3,75 ccm.

Organpulver 0,1 g.

M/10 Phosphatgemisch von Ph 6.8 1,25 ccm.

Kontroll-Lösung:

Dest. Wasser 3,75 ccm.

Organpulver 0,1 g.

M/10 Phosphatgemisch von Ph 6.8 1,25 ccm.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle XV zusammengestellt.

Wie aus dieser Tabelle erbellet, blieb das Dibenzoyl-*l*-Tyrosin nicht nur von dem Nierenpräparate des Schweins unbeeinflusst,

TABELLE XIV.

Monobenzoyl-*l*-Tyrosin.

7,5 ccm M/10 Natriumsalzlösung des Monobenzoyl-*l*-Tyrosins verbrauchten  
bei Titration 7,35 ccm n/10 HCl.

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuch in ccm (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in ccm (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	7,32	2,28	31,0
	24	9,60		
Schweine- leber	0	7,32	0	0
	24	7,31		
Schweine- muskel	0	7,33	0,02	0
	24	7,35		
Hunde- niere	0	7,33	0	0
	24	7,32		
Hunde- leber	0	7,35	0	0
	24	7,33		
Hunde- muskel	0	7,34	0	0
	24	7,32		
Hühner- niere	0	7,34	0,03	0
	24	7,37		
Hühner- leber	0	7,34	0,02	0
	24	7,36		
Hühner- muskel	0	7,34	0,02	0
	24	7,36		

TABELLE XV.

Dibenzoyl-*l*-Tyrosin.

3,75 cem M/10 Natriumsalzlösung des Dibenzoyl-*l*-Tyrosins verbrauchten  
bei Titration 3,74 cem n/10 HCl.

Organe	Stunden	Differenz des Säureverbrauches bei Haupt- u. Kontroll- versuch in cem (n/10 HCl)	Zunahme des Säureverbrauches in cem (n/10 HCl)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	3,73	0,02	0
	24	3,75		
Schweine- leber	0	3,74	0	0
	24	3,73		
Schweine- muskel	0	3,73	0	0
	24	3,73		
Hunde- niere	0	3,74	0	0
	24	3,73		
Hunde- leber	0	3,72	0,01	0
	24	3,73		
Hunde- muskel	0	3,73	0,01	0
	24	3,74		
Hühner- niere	0	3,73	0	0
	24	3,73		
Hühner- leber	0	3,75	0	0
	24	3,74		
Hühner- muskel	0	3,71	0	0
	24	3,74		

sondern es wurde auch von allen anderen Organpräparaten nicht hydrolysiert.

Dieses Ergebnis bedeutet, dass die gebrauchten Organpräparate nicht alle imstande sind, durch ihre fermentative Wirkung die Aminogruppen des Dibenzoyl-*l*-Tyrosins freizumachen. Vorausgesetzt nun, dass bei diesen Versuchen die an die Oxygruppen des Tyrosins gebundenen Benzoylgruppen in Freiheit gesetzt sind, sind sie doch mit Linderström-Lang'scher Methode nicht nachweisbar. Hierauf habe ich statt dieser mit Willstätter-Waldschmidt-Leitz'scher Methode, und zwar in gleicher Anordnung wie bei den vorstehenden Versuchen, die Untersuchung ausgeführt. Dadurch konnte ich bei den Versuchen mit dem Präparate aus Schweinemuskeln eine Zunahme der Karboxylgruppen nachweisen. Bei diesem Falle wurde die Karboxylenzunahme auch nach 48 Stunden geprüft. Die Zahlen sind in der Tabelle XVI zusammengestellt.

Also wirkt das Muskelpräparat des Schweins auf das Dibenzoyl-*l*-Tyrosin so ein, dass es keine Zunahme der freien Aminogruppen, sondern die der freien Karboxylgruppen verursacht. Diese Tatsache beweist, dass das Muskelpräparat von Schwein fähig ist, die an die Oxygruppen des Tyrosin gebundenen Benzoylgruppen zu hydrolysieren.

Natürlich bedeutet diese Reaktion nicht die Auflösung der CO-NH-Bindung; es ist also nicht richtig, diese mit den anderen schon erwähnten Hydrolysenreaktionen zusammenzufassen. Sie ist aber darum interessant, weil das Monobenzoyl-*l*-Tyrosin durch Umwandlung in das Dibenzoyl-*l*-Tyrosin als Substrat eine neue Beschaffenheit bekommt.

### III. ÜBER DIE HYDROLYSE DES BENZOYLASPARAGINS DURCH DAS HISTOZYM.

Dass das Benzoylasparagin durch Nierenpräparate von Schweinen, Hunden und Hühnern gespalten wird, ist schon

TABELLE XVI.  
Dibenzoyl-*l*-Tyrosin.

Organe	Stunden	Differenz des Alkaliverbrauches bei Haupt- u. Kontrollversuch in ccm (n/10 KOH)	Zunahme des Alkaliverbrauches in ccm (n/10 KOH)	Spaltung in Prozenten
Schweine- niere	0	0,26		
	24	0,25	0	0
	48	0,24	0	0
Schweine- leber	0	0,28		
	24	0,27	0	0
	48	0,30	0,02	0
Schweine- muskel	0	0,25		
	24	0,52	0,27	7,2
	48	0,65	0,40	10,6
Hunde- niere	0	0,28		
	24	0,31	0,03	0
	48	0,25	0	0
Hunde- leber	0	0,27		
	24	0,25	0	0
	48	0,27	0	0
Hunde- muskel	0	0,26		
	24	0,24	0	0
	48	0,28	0,02	0
Hühner- niere	0	0,28		
	24	0,26	0	0
	48	0,25	0	0
Hühner- leber	0	0,26		
	24	0,25	0	0
	48	0,25	0	0
Hühner- muskel	0	0,26		
	24	0,30	0,04	0
	48	0,26	0	0

erwähnt. Das ist nichts anderes, als dass bei dieser Hydrolysenreaktion eine Zunahme der basischen Gruppen stattfindet, welche durch Linderström-Lang'sche Methode nachgewiesen wurde. In diesem Falle ist aber auch die Möglichkeit denkbar, dass die Hydrolyse des Benzoylasparagins an der Säureamidbindung stattfindet, und infolgedessen Benzoylasparaginsäure und Ammoniak gebildet werden. Um diese Frage zu lösen, wurde der nächste Versuch ausgeführt.

Die Versuchslösung bestand aus:

M/10 Natriumsalzlösung des Benzoylasparagins	45,0 cem.
Pulverisierte Hühnernieren	1,2 g.
M/10 Phosphatgemisch von Ph 6,8	15,0 cem.

Unter Toluolzusatz wurde dieses Gemisch im Thermostaten bei 37°C stehen gelassen. Nach 10 Tagen wurde das Gemisch abfiltriert, das Filtrat wurde mit Phosphorsäure angesäuert und dann mit Essigäther extrahiert. Dieser Essigätherauszug wurde abgedampft; den Rückstand behandelte ich dann mit Petroläther und konnte dadurch die freie Benzoesäure erhalten. Die Ausbeute betrug 0,293 g, 53,3% der Theorie; der Schmelzpunkt wurde bei 121°C gefunden.

Auf Grund dieser Tatsache kann ich schliessen, dass die Spaltung des Benzoylasparagins durch das Histozyrn nicht an der Säureamidbindung, sondern an der Bindung zwischen Asparagin und Benzoesäure stattfindet.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Ich stelle nachstehend das gesamte Resultat der vorstehenden Experimente tabellarisch zusammen:

Substrat Organe	Hippur- säure	Benzoyl- alanin	Phenace- tursäure	Ornithur- säure	Benzoyl- asparagin säure	Benzoyl- glutamin- säure	Benzoyl- asparagin	Mono- benzoyl- tyrosin	Dibenzoyl- tyrosin
Schweineniere	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Schweineleber	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Schweinemuskel	+	+	+	-	-	-	-	-	* +
Hundeniere	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Hundeleber	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Hundemuskel	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Hühnerniere	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Hühnerleber	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Hühnermuskel	+	+	+	-	-	-	*	-	-

\* Hydrolyse der Bindung zwischen der Carboxyl- und Oxygruppe.

Man sieht hier das spezifische Verhalten der verschiedenen Benzoylaminosäuren gegen das Ferment, je nach der chemischen Konstitution der Aminosäurereste. Die Benzoylmonoaminomonocarbonsäuren sind durch das Histozyim hydrolysierbar, und dabei ist die Länge der C-Kette sowohl der Aminosäurereste als auch der Acylreste ohne Belang. Wenn eine zweite Aminogruppe in solche Aminosäure eingeführt wird, bekommt ihre Benzoylverbindung nun eine spezifische Eigenschaft als enzymatisches Substrat. Sie ist ausschliesslich nur durch das Nierenferment angreifbar. Wenn aber andererseits eine zweite Carboxylgruppe in die Monoaminomonocarbonsäure eingeführt wird, versagt ihre Benzoylverbindung aufs stärkste die fermentative Spaltung. Dieses sonderbare Verhalten wird interessanterweise aufgehoben durch weitere Verknüpfung einer Amidgruppe mit der freien Karboxylgruppe. Der Benzoessäurerest wird nun fermentativ labil. Man kann vielleicht hier ein weiteres Beispiel der biologischen Bedeutung der Säureamidgruppe anerkennen. (R. Nakashima, 1927). Der Einfluss des chemischen Baues der Aminosäurereste gipfelt bei Tyrosin. Das Monobenzoyltyrosin wird nur von der Schweineniere

hydrolysiert. Hatte man bei dem Benzoylderivate des Ornithins und Asparagins eine auffallende Fermentverteilung unter den Organen beobachtet, so beschränkt sich jetzt das wirksame Ferment nur auf ein Organ eines Tieres, auf die Schweineniere. Die Einführung der anderen Benzoylgruppe an die Hydroxylgruppe des Tyrosins verändert, bemerkenswerterweise das Verhalten gegen das Ferment weiter. Das Dibenzoyltyrosin wird nicht mehr von sowohl Schweineniere als auch anderen Organpräparaten verschiedener Tiere gespalten, aber doch vom Schweinemuskel. Die Hydrolyse findet dabei an der Bindung zwischen Benzoesäure und Oxygruppe der Aminosäure statt. Durch die zweite Benzoylgruppe hat das Benzoyltyrosin seine fermentative Vorgeschichte verloren und kommt als ein neues fermentatives Substrat zu Tage. Auch hier sieht man eine eigentümliche Verteilung der benzoesäureabspaltenden Fermente unter den Organen und den Tieren.

## LITERATUR.

- Fischer, E.: Gesammelte Werke, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine I, Berlin 1906.  
 Jaffe, M. (1877): Ber. deut. chem. Gesell., 10, 1925.  
 Kimura, H. (1928): Jour. of Biochem., 10, 207.  
 Linderström-Lang, K. (1927): Zs. f. Physiol. Chem., 173, 32.  
 Mutch, N. (1912): Jour. of Physiol., 44, 176.  
 Nakashima, R. (1927): Jour. of Biochem., 7, 399.  
 Schmiedeberg, O. (1881): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 14, 379.  
 Smorodinzew, J. A. (1923): Zs. f. physiol. Chem., 124, 123.  
 Tamura, S. (1924): Acta schol. med. univers. Imp., Kioto, 6, 467.  
 Willstätter, R. u. Waldschmidt-Leitz, E. (1921): Ber. deut. chem. Gesell., 54, 2988.



## ÜBER DIE BILIRUBINBILDUNGSFÄHIGKEIT DER ÜBERLEBENDEN MILZ VON MIT THORIUM- DIOXYDSOL BEHANDELTEN HUNDEN.

VON

SUSUMU TSUNOO UND HIDEO NAKAMURA.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. S. Tsunoo,  
Nagasaki.)

(Eingegangen am 18. Mai 1930.)

Dass die Milz nicht nur im normalen, sondern auch im pathologischen Zustand Gallenfarbstoff zu bilden vermag, darf als eine bewiesene Tatsache angesehen werden. Welche Zellelemente in der Milz dabei die Hauptrolle spielen, muss noch aufgeklärt werden. Schon die Tatsache, dass die Milz an Retikuloendothelialzellen sehr reich ist, legt die Vermutung nahe, dass diesen Zellen die Bilirubinbildungsfähigkeit zukommt. Tatsächlich konnte Ishibashi (1928) durch Gewebeskultur konstatieren, dass die Retikulumzellen die innigste Beziehung zu der Bilirubinbildung haben. Nun könnte man erwarten, dass die Milz von Hunden, deren Retikuloendothelien mit irgendeiner Substanz blockiert wurden, ihre Bilirubinbildungsfähigkeit mehr oder weniger einbüßen würde. Aber wenn man einwandfreie Ergebnisse in dieser Hinsicht haben will, muss man die Untersuchungen an der isolierten, überlebenden Milz anstellen, sonst kann man die Mitwirkung anderer Organe gar nicht ausschliessen. Schon 1925 durchströmten Z. Ernst und J. Förster die überlebende Milz von mit Collargol und kolloidalem Eisen behandelten Hunden. Aber eine Beeinflussung der Bilirubinbildung konnte von ihnen nicht beobachtet werden. Im Jahre 1928 gelang es dagegen Sakakibara, durch Vorbehandlung mit Collargol diese Fähigkeit der Hundemilz zu beeinträchtigen. Also erscheint es sehr wünschenswert, die Versuche einer Revision zu unterziehen, um festzustellen, welche von beiden Beobachtungen zu

Recht bestehen dürfte, zumal es sich um ein negatives Resultat handelt, das schon leicht durch verschiedene technische Fehler entstanden sein könnte.

Die sogenannte Blockierung des Retikuloendothelsystems, die sich heute als Untersuchungsmethode einer sehr weiten Verbreitung erfreut, hat ihre grösste Schwäche darin, dass man bei einem Experiment im voraus nicht sicher sagen kann, ob die Retikuloendothelien durch das benutzte Blockierungsmittel z. B. Collargol, tatsächlich blockiert werden. Die meisten Arbeiten, denen die Blockierung der Retikuloendothelien als Vorbehandlung vorausgeht, beruhen also notwendig auf einer sehr unsicheren Voraussetzung. Wenn man dagegen als Voraussetzung nicht eine vermutete, sondern eine bewiesene Blockierung haben will, muss man entweder ein biologisches Zeichen finden, das als eine Folge der Blockierung im Organismus auftritt und eine vollständige Blockierung anzeigt, oder aber ein Mittel haben, das selbst fähig ist, die Blockierung anzuzeigen. Für letzteren Zweck ist das Thoriumdioxydsol sehr geeignet, das, von Blühbaum, Frik und Kalkbrenner für die Bronchoradiographie eingeführt (1928), zuerst von Oka (1929) zur Lienographie, d.h. zur positiven röntgenologischen Darstellung der Milz gebraucht wurde. Die Untersuchungen von Oka wurden von Radt und Jaffé (1929) einerseits, von Mori und Tsunoo (1929) anderseits bestätigt. Nach den eingehenden Untersuchungen von Mori (1930) beruht die Schattenbildung der Milz auf dem von den Retikuloendothelien aufgespeicherten Thoriumdioxyd, sodass dasselbe Mittel auch als Blockierungsmittel gebraucht werden kann. Dann kann der Grad der Blockierung, je nach der Intensität des Milzschattens, in gewissem Masse beurteilt werden. Selbstverständlich darf die Schattenbildung nicht ohne weiteres als Beweis für die vollständige Lähmung der Retikuloendothelien der Milz angesehen werden. Doch bedeutet die erwähnte Eigenschaft des Thoriumdioxydsols im Vergleich zu anderen Blockierungsmitteln einen grossen Fortschritt in der Erforschung des Retikuloendothelsystems.

Wir haben nun zur Entscheidung der Frage, ob die blockierte Hundemilz noch die Fähigkeit beibehalte, Bilirubin zu bilden, als Blockierungsmittel das Thoriumdioxydsol gebraucht, das von Tsunoo selbst nach der Vorschrift von Blühbaum und seinen Mitarbeitern und von Oka dargestellt wurde. Das Thoriumdioxydsol wurde gesunden Hunden als 5-prozentige Kolloidallösung unter Zusatz von Traubenzucker, dessen Konzentration ebenfalls 5% betrug, in der Dosis von 0,15 g  $\text{ThO}_2$  pro Kilo Körpergewicht intravenös einmal oder wiederholt injiziert, sodass die Gesamtdosis pro Kilo Körpergewicht zwischen 0,15 und 0,9 g schwankte. Dabei wurde die Injektion an ein und demselben Tag nicht mehr als zweimal ausgeführt. Wenn die Tiere durch die Injektion geschwächt wurden, musste eine Pause von einem Tage eingeschaltet werden. Trotzdem gingen vier von den Tieren, denen das Mittel in einer Gesamtdosis von 0,9 g pro Kilo Körpergewicht injiziert wurde, entweder direkt nach der letzten Injektion oder 7–30 Tage nach derselben, bevor der Durchströmungsversuch angestellt wurde, ein. In der ersten Versuchsreihe wurde die Milz 1–2 Tage nach der letzten Injektion exstirpiert und mit dem eigenen, defibrinierten teilweise hämolysierten Blut durchströmt. In der zweiten Versuchsreihe wurde die Durchströmung erst 14–30 Tage nach der Vollendung der Injektion ausgeführt.

Vor und nach der Injektion wurde als Regel die röntgenologische Aufnahme der Milz vorgenommen, um nach der Intensität des Schattens den Blockierungsgrad zu beurteilen.

Die Durchströmungsmethode war ganz dieselbe, wie sie in der Arbeit von Komori und Iwao (1927) beschrieben wurde, sodass es unnötig erscheint, sie hier wieder zu besprechen.

Die Versuchsergebnisse sind in der beigegebenen Tabelle zusammengestellt. Die Kontrollversuche, die an der normalen Hundemilz angestellt wurden, zeigen, entsprechend den Resultaten sowohl von Ernst und Szappanyos, als auch von Komori und Iwao, positive Bilirubinbildung. Die Hauptversuche, die an der Milz von mit Thoriumdioxydsol behandelten Hunden angestellt

wurden, ergaben verschiedene Resultate, einerseits je nach der injizierten Dosis von Thoriumdioxydsol, anderseits je nach dem Zeitintervall zwischen der Injektion und Durchströmung. In der ersten Versuchsreihe ist die Bilirubinbildung noch bis zur Gesamtdosis von 0,45 g Thoriumdioxydsol pro Kilo Körpergewicht möglich. Wenn die Gesamtdosis pro Kilo Körpergewicht 0,6 g und darüber beträgt, kann Bilirubinbildung nicht mehr nachgewiesen werden. Mit der steigenden Dosis von  $\text{ThO}_2$  wird der Schatten der Milz ebenfalls stärker, wie aus der Tabelle zu ersehen ist. Aber die Hundemilz ist sehr oft schon ohne Injektion von  $\text{ThO}_2$  auf der Röntgenplatte nachweisbar. Wenn also die Schattenintensität der Milz vor und nach der Injektion keinen Unterschied zeigte, dann ist dies in der Tabelle mit (—) angegeben. Wenn dagegen ein Unterschied nachweisbar war, dann ist dies je nach dem Unterschiedsgrad mit (+) oder (‡) angegeben.

In der zweiten Versuchsreihe sollte verfolgt werden, wann die einmal verlorene Bilirubinbildungsfähigkeit wieder zurückkehrt. Diese Versuchsreihe wurde nur an der Milz von solchen Hunden angestellt, die mit der Gesamtdosis von 0,9 g  $\text{ThO}_2$  behandelt wurden, weil es hier darauf ankam, die Fähigkeit der Milz, Bilirubin zu bilden, einmal sicher zu lähmen, und weil sich aus der ersten Versuchsreihe heraus ergab, dass die genannte Dosis zu diesem Zweck genügte. Nun zeigt die Tabelle, dass die Bilirubinbildung nach zwei bis drei Wochen noch stark gehemmt ist und sich erst nach einem Monate in erheblichem Masse wiederherstellt. Dieser Befund entspricht der Tatsache, dass die Retikuloendothelien immer noch regenerieren können. In dieser Versuchsreihe wurde die Röntgenaufnahme der Milz ausser vor und nach der Injektion noch vor dem Durchströmungsversuche ausgeführt. Aber die Schattenintensität zeigte nach der Injektion und vor der Durchströmung keine Differenzen.

Aus unseren Versuchen darf jedenfalls geschlossen werden, dass bei der Bilirubinbildung der Milz die Retikuloendothelien eine wesentliche Rolle spielen.

Versuchsnummer	Datum der Durchblutung	Geschlecht	Gewicht des Hundes	Gesamtdosis von ThO <sub>2</sub> pro Kilo Gewicht	Röntgenschat-ten der Milz	Intervall zwischen der letzten Infektion und der Durchströmung	Asphyxie-Zeit	Zur Durchblutung gebrauchte Blutmenge		Durchblutungsdauer	Bilirubingehalt des Blutes			
								totale Menge	hämoly-sierter Anteil		Zu Beginn des Versuches	Am Ende des Versuches	Qualitative Untersuchung (indirekte Diazo-reaktion)	in 100 cem Blut
Kontrolle	5/10	♂	14,0	g	(-)		Min. 14	cem 210	cem 10	Std. 4	(-)	(+)	Spur	mg 0,82
	1929	♀	14,3		(-)		20	200	10	2,5	(-)	(#)	(#)	2,07
	21/10	♀	13,2		(-)		18	190	10	3,5	(-)	(#)	(#)	

I. Versuchsreihe

10	14/11	♂	16,7	0,15	(-)	1	10	220	10	4	(-)	(#)	0,64
9	7/11	♂	11,2	0,30	(+)	2	15	195	10	4	(-)	(#)	0,56
8	2/11	♂	11,7	0,30	(+)	1	17	190	10	3,5	(-)	(#)	2,31
4	19/9	♂	12,0	0,45	(+)	1	17	215	10	4	(-)	(+)	Spur
3	14/9	♂	6,7	0,60	(#)	2	14	230	10	4	(-)	(-)	
5	30/9	♂	12,0	0,60	(#)	2	13	185	10	4	(-)	(-)	
6	26/10	♂	11,3	0,75	(#)	1	20	218	10	4	(-)	(-)	
7	30/10	♂	8,4	0,90	(#)	2	20	194	10	4	(-)	(-)	

II. Versuchsreihe

11	10/12	♂	9,6	0,90	(#)	14	16	190	10	4	(-)	(+)	Spur
12	9/12	♂	13,1	0,90	(#)	14	12	190	10	4	(-)	(+)	Spur
13	11/2	♂	8,7	0,90	(#)	23	20	190	10	4	(-)	(+)	
14	1930	♂	9,7	0,90	(#)	30	7	190	10	4	(-)	(+)	0,30
15	27/2	♂	10,9	0,90	(#)	30	12	160	10	4	(-)	(+)	0,54

## LITERATUR.

- Blühbaum, Th., K. Frik und H. Kalkbrenner (1928): Fortschritte  
auf d. Geb. d. Röntgenstr., **37**, 18.  
Ernst, Z. und J. Förster (1925): Bioch. Zeitschr., **157**, 492.  
Ishibashi, M. (1928): Ikai-Jiho, Nr. 1755, 607.  
Jaffé, R. (1929): Fortschritte auf d. Geb. d. Röntgenstr., **40**, 692.  
Komori, Y. und C. Iwao (1927): Journ. of Biochem., **8**, 195.  
Mori, M. (1930): Nihon-Röntgen-Gakkai-Zasshi. (in Vorbereitung).  
Mori, M. und S. Tsunoo (1929): Kyushu-Igakkai-Shi (in Vorbereitung).  
Oka, M. (1929): Fortschritte auf d. Geb. d. Röntgenstr., **40**, 497.  
Radt, P. (1929): Kl. Wochenschr., 2128.  
Sakakibara, T. (1928): Nihon-Geka-Gakkai-Zasshi, **29**, 858.

## DIE BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL. (VIII).

Über den Mechanismus der hypoglykämischen Wirkung  
der Gallensäure.

VON

KANEJI TSUJI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 23. Mai 1930.)

Durch die Untersuchungen vieler Autoren wie Misaki (1927), Hatakeyama (1927, 1929), Taku (1928), Murakami (1928), Okamura (1928), Adlersberg und Roth (1927) ist Klarheit darüber gewonnen worden, dass die Gallensäure zu dem Haushalt der Kohlehydrate in inniger Beziehung steht und dass sie im Kohlehydratsstoffwechsel im Organismus als regulierender Faktor, indem sie gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt, eine grosse Rolle spielt.

Durch die Versuche von Misaki ist gezeigt worden, dass die Gallensäure sowohl den nüchternen Blutzucker als auch die experimentell durch Zufuhr von Traubenzucker erzeugte Hyperglykämie herabsetzt und die Adrenalinsekretion der Nebenniere hemmt. Nach Okamura und Murakami wird die Adrenalinsekretion der Nebenniere durch den überschüssigen Gehalt an Gallensäure herabgesetzt indem sich der Blutzuckerspiegel durch den Einfluss der Gallensäure vermindert. Dagegen wird die Adrenalinsekretion der Nebenniere gesteigert, wenn sich der Gehalt der Gallensäure im Organismus vermindert, indem der Blutzucker durch vermehrtes Adrenalin gesteigert wird.

Seit Claud Bernard (1854, 1855) und Blum (1901, 1902) steht fest, dass das vegetative Nervensystem zum Kohlehydratstoff-

wechsel in inniger Beziehung steht, und dass ein am Boden der Rautengrube gelegenes Nervenzentrum den Glykogenhaushalt der Leber beherrscht. Wird es durch den Zuckerstich verletzt, so antwortet die Leber durch Abbau von Glykogen, und es erscheint Hyperglykämie und Zucker im Harn. Über den Mechanismus dieser nervösen Regulierung des Kohlehydratstoffwechsels sind die Meinungen der verschiedenen Autoren verschieden. Nach Eppinger, Falta und Rudinger (1906), Kahn (1909, 1911), Kahn u. Starkenstein (1911), Waltermann (1908), Carrasco-Formiguera (1922), Shimizu (1924), Jarisch (1913), Fujii (1918) und Schlossmann (1927) soll der Zuckerstich unter Vermittelung der Nebenniere (=des Adrenalins) auf die Leber einwirken, indem er Hyperglykämie und Glykosurie hervorruft. Nach Freund und Marchand (1914), Wertheimer und Battezz (1912) und Gigon (1912) soll er dagegen unter Vermittelung der N. splanchnici direkt auf die Leber einwirken. MacLeod und Pearce (1912) und Dresel (1924) behaupten, dass der Zuckerstich entweder unter Vermittelung des Adrenalins von der Nebenniere aus auf die Leber oder unter Vermittelung der N. splanchnici direkt auf die Leber einwirkt. Uns scheint wahrscheinlich, dass der Zuckerstich unter Vermittelung der Nebenniere die Glykolyse der Leber bewirkt und dadurch Hyperglykämie und Glykosurie herbeiführen kann.

Es ist sehr beachtenswert, dass Brugsch, Dresel und Lewy (1920, 1921) behaupten, dass in der Medulla oblongata eine parasympathische Zellgruppe nach vorn der sympathischen Zellgruppe vorliegt, deren Reizung Hypoglykämie auslöst, und dass diese parasympathische Zellgruppe zur Pankreasfunktion in inniger Beziehung steht. Die sympathische Zellgruppe steht mit der Nebennierenfunktion in innigem Zusammenhang, und durch Reizung derselben wird der sogenannte *Piqure* von Cl. Bernard erreicht.

Aus diesem Grunde sieht man, dass die erregenden Fasern für das Zuckerzentrum in den N. vagi verlaufen, denn nach ihrer Durchschneidung ist der Zuckerstich wirksam und die Reizung des

zentralen Stumpfes ruft die gleiche Erscheinung hervor, und ferner, dass die zentrifugalen Bahnen durch die N. splanchnici gehen, nach deren Durchschneidung der Zuckerstich nicht mehr zum Ziele führt.

Auf Grund der Daten kann man gut verstehen, dass das Insulin gegen das Adrenalin antagonistisch wirken muss. Die antagonistische Funktion der Nerven ist nach der Behauptung von Kraus und Zondek (1924) und Zondek (1922, 1929) wohl begreiflich, die angeben, dass die nervösen Erregungen der vegetativen Organe eine Konzentrationsänderung der Elektrolyte hervorrufen, die sich entsprechend der antagonistischen Funktion der Nerven in zweifacher verschiedener Weise auswirken kann, und dass die Wirkung der Nerven durch die der Elektrolyte ersetzt werden kann.

Es wird auch durch die Versuche von Barsch (1924) und Zondek u. Banett (1925) gezeigt, dass das Calciumion im Sinne der Sympathikusreizung den Blutzuckergehalt steigert, dagegen das Kaliumion im Sinne der Parasympathikusreizung denselben herabsetzt. Richtig hat auch Taku (1928) in seinem Versuch beobachtet, dass das Calciumion die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure hemmt, dagegen das Kaliumion dieselbe fördert. Auf Grund dieser Tatsachen kann man wohl vermuten, dass die Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel mit der vegetativen Nervenfunktion einen innigen Zusammenhang hat, und zwar dass die Gallensäure auf den Sympathikus hemmend und auf den Parasympathikus reizend wirken könnte, wenn die sympathische Wirkung durch das Calciumion und die parasympathische Wirkung durch das Kaliumion ersetzt werden könnte, wie das Zondek (1929) in seinem Versuche behauptet hat.

In diesem Sinne ist es interessant, zur Erklärung des Mechanismus der hypoglykämischen Wirkung der Gallensäure, die Beziehung zwischen der Gallensäurewirkung und der vegetativen Nervenfunktion zu erforschen.

Nun haben Rupp (1925), Dresel u. Omonsky (1927) und

Hisamoto (1928) beobachtet, dass durch Splanchnikotomie die Adrenalinhyperglykämie herabgesetzt, die Insulinhypoglykämie dagegen verstärkt wird, während die Vagusdurchschneidung verstärkte Adrenalinhyperglykämie und Insulinhypoglykämie zur Folge hat. Auf die verstärkte Insulinhypoglykämie haben Dresel u. Omonsky schon hingewiesen, dass nämlich die gesteigerte Insulinhypoglykämie bei Vagotomie auf dem noch zurückgebliebenen postganglionären Neuron der N. vagi beruht, weil bei Vagotomie unter dem Oesophagus nur die präganglionären Fasern durchschnitten werden.

Was den Zuckerstich betrifft, so wurde durch den Versuch von Ohara (1925) gezeigt, dass Hyperglykämie bei Zuckerstich durch Zufuhr von Pankreasextract gehemmt wird.

Wenn sich dem Abfluss der Galle in den Darm ein Hindernis, wie Gallenstein oder Tumor neben dem Gallenweg entgegenstellt, so wird Stauungsikterus hervorgerufen, und die Gallensäuren werden den Geweben und Organen zugeführt. Dadurch muss die vegetative Nervenfunktion beeinflusst werden. Nach Westphal (1923) hat die Vagusreizung eine Gallenstauung zur Folge, indem die Gallenblase oder der Gallengang zur Kontraktion gebracht wird, während die Vaguslähmung oder Splanchnikusreizung das Umgekehrte zur Folge hat. Matsuo (1924), Yamauchi und Ohta (1925) haben beobachtet, dass unter den gallensteinleidenden Kranken 68% in einen vagotonischen Zustand versetzt werden, und sie haben sich der Meinung von Westphal angeschlossen. Obwohl die meisten Autoren wie Frerichs (1861), Minkowski (1886) und Quinke (1884) behaupten, dass die Cholämie entweder auf der Leberinsuffizienz oder der Leberintoxikation beruht, ist es doch möglich, dass dieselbe teilweise durch die überschüssige Gallensäure im Blut bedingt wird, die das zentrale Nervensystem beeinflusst.

Nach Bertram (1928) und Taku (1928) hat die Gallensäure mit Insulin synergisch hypoglykämische Wirkung. Durch die Untersuchungen von Horsters u. Rothmann (1929) und Taku (1929) wurde bewiesen, dass die Gallensäure nicht nur eine hypo-

glykämische, sondern auch eine die Zuckertoleranz steigernde Wirkung hat.

In oben erwähntem Sinne habe ich das Thema aufgenommen, einerseits um festzustellen wie die Gallensäure das vegetative Nervensystem beeinflusst, wenn sie bei Überschuss dem Blut zugeführt wird: z. B. Cholämie, und welch nervöser Regulationsmechanismus sich beim Kohlehydratstoffwechsel im Organismus bzw. in der Leber, physiologisch darbietet, andererseits in der Hoffnung klarstellen zu können, ob die Gallensäure das Nervenzentrum angreifend beeinflussen kann.

### Experimenteller Teil.

Zum Versuch wurden gut ausgewachsene, mittelgrosse Kaninchen verwendet, die unter möglichst gleichen Bedingungen gezüchtet worden waren. Zuerst wurde der Einfluss der Gallensäure auf den nüchternen Blutzucker des normalen Kaninchens nachgeprüft.

Dann wurde der Einfluss der Gallensäurezufuhr auf den nüchternen Blutzucker des beiderseits splachnikotomierten und vagotomierten Kaninchens beobachtet. Die Resultate wurden mit denen vor der Operation verglichen, um die Beziehung zwischen der hypoglykämischen Wirkung der Gallensäure und der vegetativen Nervenfunktion klarzustellen.

Endlich wurde der Einfluss der Gallensäure auf die durch den Zuckerstich eintretenden Hyperglykämie und Glykosurie geprüft, um zu sehen, ob die Gallensäure auf das Zuckerzentrum wirkt, und ob dadurch die Hyperglykämie und Glykosurie beeinflusst werden.

Der Blutzuckergehalt wurde nach der neuen Bangschen Methode, und der Zuckergehalt im Harn nach dem Bertrandschen Verfahren bestimmt.

#### *I. Einfluss der Gallensäurezufuhr auf den nüchternen Blutzucker.*

Nach 15–18 Stunden langem Hungern wurde dem Kaninchen 1.0–3.0 ccm einer 1%igen Natriumeholatlösung pro kg Körper-

gewicht subkutan injiziert und der Blutzuckergehalt in einem bestimmten Zeitintervall bestimmt. Bei 8 Versuchen zeigte sich ohne Ausnahme ein Abfall des Blutzuckers, wie schon Misaki in seinem Versuch bewiesen hat. Die Resultate sind in Tabelle I. zusammengestellt.

TABELLE I.  
Versuch mit Cholsäure.

Nr.	Körpergewicht in g	Injizierte Cholat- menge in cem pro kg Körpergewicht	Blutzucker vor der Injektion in %	Blutzucker nach Stunden:							
				1/2	1	2	3	4	5	6	7
1	2250	1.0	0.109	0.107	0.098	—	0.091	0.097	0.105	0.103	0.113
2	2850	2.0	0.110	0.114	0.083	0.090	0.101	0.105	0.109	0.094	0.106
3	2410	„	0.111	0.123	0.099	0.099	0.098	0.095	0.099	0.118	—
4	1810	„	0.126	0.119	0.127	0.122	0.109	0.099	0.105	0.108	0.104
5	2380	2.5	0.087	0.088	0.081	0.067	0.073	0.082	0.094	0.082	0.086
6	2340	3.0	0.097	0.100	0.081	0.069	0.082	0.088	0.096	0.099	0.101
7	2220	„	0.109	0.112	0.101	0.099	0.086	0.082	0.091	0.074	0.076
8	2030	„	0.117	0.108	0.106	0.090	0.088	0.104	0.104	0.109	0.110

Die Tabelle I zeigt, dass der Abfall des Blutzuckers im allgemeinen in der 2.-3. Stunde nach der Zufuhr der Gallensäure eintritt, um nach der 6.-7. Stunde wieder den Anfangswert zu erreichen.

Der Blutzucker fällt um 14-32% des Ausgangswertes ab, und der Grad des Blutzuckerabfalls ist um so stärker, je mehr Gallensäure zugeführt wird. Weil der Nukleinstoffwechsel durch Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird und dadurch Pentosurie eintritt, wie Karasawa (1926) und Kobayashi (1928) schon bewiesen haben, muss man berücksichtigen, dass die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch Pentosen im Blut beeinflusst wird.

## II. Einfluss der Gallensäure auf den Blutzucker des splanchnikotomierten Kaninchens.

Es ist bekannt, dass die vegetativen Organe, wie Leber und Nebenniere, von Vagus und Sympathikus innerviert werden, und der Adrenalingehalt der vom Sympathikus innervierten Nebenniere je nach der Menge der Gallensäure im Blut beeinflusst wird. In Anbetracht dieser Tatsachen ist es interessant, den Einfluss der Gallensäure auf den nüchternen Blutzucker des splanchnikotomierten Kaninchens zu prüfen.

Die Splanchnikotomie wurde nach der Methode von Schulze (1900) ausgeführt. In 1–2 Tagen erholt sich das Kaninchen von der Operation und frisst gern, wie gewöhnlich vor der Operation. Dabei zeigt sich Hypoglykämie, und das Körpergewicht vermindert sich. Diese Hypoglykämie wird durch irgendeine kompensatorische Wirkung wieder zum normalen Wert gebracht (Tabelle II a).

Innerhalb von 3–21 Tagen nach der Splanchnikotomie wurde dem splanchnikotomierten Kaninchen, nachdem es 15–18 Stunden gehungert hatte, 2.0–4.0 ccm einer 1%igen Natriumcholatlösung oder 1.0–3.0 ccm einer 1%igen Natriumdesoxycholatlösung pro kg Körpergewicht subkutan zugeführt, und in einem bestimmten Zeitintervall der Blutzucker bestimmt.

Die Tabelle II b zeigt, dass der Blutzuckergehalt sowohl bei Zufuhr der Cholsäure als auch bei der der Desoxycholsäure durch Splanchnikotomie entweder gar nicht beeinflusst oder sogar gesteigert wird.

Daher scheint mir die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch die Durchschneidung der N. splanchnici aufgehoben zu werden. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Gallensäure durch die Bahn der N. splanchnici lähmend wirkt, und infolgedessen eine verminderte Adrenalinsekretion der Nebenniere die Folge ist. Es scheint mir ferner, diese verminderte Adrenalinsekretion eine verminderte glykogenolytische Wirkung auf die Leber und den Muskel zur Folge zu haben. Daraus kann man

TABELLE II(a).

Nr.	Tage nach der Splanchnikotomie	Körpergewicht in g	Blutzucker (%)	Nr.	Tage nach der Splanchnikotomie	Körpergewicht in g	Blutzucker (%)	Nr.	Tage nach der Splanchnikotomie	Körpergewicht in g	Blutzucker (%)
1	vor	1800	0.097	5	vor	2480	0.092	10	vor	2350	0.108
	1	1600	0.083		1	2240	0.083		1	1150	0.096
	2	1490	0.097		2	2240	—		2	2150	0.105
	3	1520	0.096		3	2120	0.105		3	2105	0.106
	4	1535	0.098		4	2190	0.103	11	vor	2120	0.099
	5	1530	—		5	2160	0.106		1	1950	0.083
	6	1590	0.096	6	vor	2360	0.097		2	1940	0.109
	7	1585	0.098		1	2090	0.083		3	1910	0.107
2	8	1585	0.095		2	2050	—	12	vor	2060	0.098
	vor	2380	0.103		3	1900	0.101		1	1930	0.089
	1	2185	0.101		4	2010	0.104		2	1780	0.101
	2	2030	—		5	—	—		3	1915	0.106
	3	2035	—	7	6	2000	0.102	13	vor	2910	0.107
	4	1910	—		vor	2585	0.102		1	2700	0.067
	5	1885	—		1	2600	0.083		2	2695	0.100
	6	1895	—		2	2600	0.107		3	2560	0.098
	7	1900	0.104		3	2550	0.105	14	vor	2660	0.104
3	vor	2390	0.099		4	2530	0.106		1	2540	0.099
	1	2250	0.090		5	2450	0.106		2	2500	—
	2	2250	0.108	8	vor	2480	0.100		3	2510	0.105
	3	2220	0.106		1	2385	0.081	15	vor	2185	0.106
	4	2230	0.109		2	2240	0.106		1	1960	0.092
	5	2165	0.106		3	2210	0.101		2	1900	0.115
4	vor	2095	0.105		4	2210	0.103	16	vor	2250	0.122
	1	2000	0.083	9	vor	2165	0.108		1	2120	—
	2	2010	0.107		1	2040	0.108		2	2180	0.114
	3	1925	0.105		2	2040	0.112	17	vor	2020	0.108
	4	2055	0.102		3	1930	0.098		1	1890	0.108
	5	2040	0.106		4	1910	0.108				

TABELLE II(b).

## 1) Versuch mit Cholsäure.

Nr.	Körpergewicht in g	Tage nach der Splanchnikotomie	Injizierte Cholat- menge in ccm pro kg Körpergewicht	Blutzucker vor der Injektion in (%)	Blutzucker nach Stunden:							
					1/2	1	2	3	4	5	6	7
1	1995	4	2.0	0.105	0.121	—	0.108	0.110	0.115	0.116	0.117	0.114
2	1910	3	"	0.099	0.098	0.103	0.101	0.104	0.111	0.106	0.102	0.103
3	2070	15	"	0.103	0.104	0.105	0.111	0.115	0.112	0.109	0.111	0.114
4	1870	16	3.0	0.105	0.101	0.110	0.104	0.107	0.109	0.104	0.107	0.106
5	1950	7	"	0.100	0.106	0.103	0.104	0.105	0.108	0.105	0.104	0.103
6	2580	7	"	0.106	0.106	0.105	0.108	0.108	0.105	0.096	0.103	0.102
7	1880	3	"	0.102	0.102	0.100	0.108	0.097	0.103	0.096	0.103	0.094
8	2680	5	4.0	0.096	0.098	0.094	0.095	0.097	0.098	0.106	0.102	0.101
9	2050	8	"	0.101	0.105	0.106	0.102	0.107	0.108	0.106	0.102	0.101

## 2) Versuch mit Desoxycholsäure.

2) Versuch mit Desoxycholsäure.												
				0.095	0.094	0.098	0.106	0.105	0.118	0.123		
1	1585	7	1.0	0.095	0.094	0.098	0.106	0.105	0.118	0.123	0.123	0.117
2	1930	9	1.5	0.106	0.101	0.110	0.111	0.115	0.114	0.116	0.117	0.114
3	2165	4	2.0	0.105	0.108	0.109	0.109	0.100	0.108	0.110	0.115	0.105
3	2165	4	2.0	0.109	0.120	0.104	0.111	0.105	0.107	0.103	0.111	0.107
4	1830	9	"	0.109	0.111	0.103	0.102	0.102	0.102	0.105	0.110	0.102
5	2420	3	"	0.099	0.111	0.103	0.107	0.115	0.112	0.109	0.111	0.103
5	2420	3	"	0.103	0.104	0.105	0.107	0.115	0.112	0.109	0.111	0.103
6	2070	15	"	0.101	0.110	0.106	0.106	0.108	0.106	0.108	0.106	0.100
7	2140	21	2.5	0.101	0.110	0.106	0.111	0.110	0.110	0.109	0.103	0.104
7	2000	9	"	0.108	0.106	0.111	0.111	0.110	0.110	0.109	0.103	0.104
8	2000	9	"	0.108	0.106	0.111	0.111	0.110	0.110	0.109	0.103	0.104
9	2190	11	3.0	0.102	0.130	0.124	0.116	0.107	0.114	0.105	0.103	0.103

schliessen, dass die Vermehrung des Glykogens bei Zufuhr der Gallensäure zum Teil durch die Lähmung der N. splanchnici bedingt ist.

### *III. Einfluss der Gallensäure auf die Adrenalinhyperglykämie und -glykosurie bei splanchnikotomierten Kaninchen.*

Bei diesem Versuch wurde als Kontrolle der einen Gruppe von splanchnikotomierten Kaninchen 0.1 cem einer 0.1%igen Adrenalinhydrochloridlösung pro kg Körpergewicht subkutan injiziert. Der anderen Gruppe wurden 3.0 cem einer 1%igen Natriumcholatlösung oder 2.5 cem einer 1%igen Natriumdesoxycholatlösung pro kg Körpergewicht subkutan zugeführt und nach Ablauf von  $\frac{1}{2}$  Stunde wurde dieselbe Menge Adrenalin wie bei der Kontrolle subkutan verabreicht.

Bei beiden Fällen wurde der Blutzuckergehalt in bestimmten Zeitintervallen fortlaufend bestimmt und verglichen. Der Harn wurde in der 6-ten Stunde nach der Injektion des Adrenalins durch Katheterisation gesammelt, und sein Zuckergehalt nach der Methode von Bertrand bestimmt. Die Resultate sind in folgender Tabelle III zusammengestellt.

Aus den Versuchen 1 und 2 der Tabelle III ist ersichtlich, dass der Blutzuckergehalt bei Zufuhr von Gallensäure mit Adrenalin, verglichen mit dem bei Zufuhr von Adrenalin allein, keinen Unterschied aufweist.

Das zeigt, dass im Gegensatz zu Misakis Versuch bei splanchnikotomierten Kaninchen die Adrenalinhyperglykämie durch Zufuhr von Gallensäure nicht herabgesetzt wird. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass die Gallensäure durch die Ausschaltung der Splanchnici keinen lähmenden Einfluss auf den Sympathikus ausübt und dadurch keine hypoglykämische Wirkung hervortritt, da ja die Adrenalinsekretion der Nebenniere unverändert bleibt.

Was den Zuckergehalt des Harns betrifft, so wurde ein solcher bei einigen Fällen weder bei der Kontrolle noch beim eigentlichen Versuch beobachtet. Aus dem Versuch von Taku (1929) geht

TABELLE III.

## 1) Versuch mit Cholsäure.

Tage nach der Operation	11	25	15	31	24
Körpergewicht (g)	2530	2350	2365	2350	2100
	bei Injektion von Adrenalin	"	" mit Cholsäure	"	"
Blutzucker vor der Injektion (%)	0.101	0.102	0.107	0.103	0.102
Blutzucker nach Stunde	$\left\{ \begin{array}{l} 1/2 \\ 1 \\ 2 \\ 3 \\ 4 \\ 5 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.224 \\ 0.283 \\ 0.253 \\ 0.211 \\ 0.156 \\ 0.107 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.186 \\ 0.219 \\ 0.239 \\ 0.190 \\ 0.151 \\ 0.106 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.209 \\ 0.252 \\ 0.264 \\ 0.237 \\ 0.175 \\ 0.105 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.152 \\ 0.205 \\ 0.237 \\ 0.233 \\ 0.189 \\ 0.109 \end{array} \right.$
Harnmenge (ccm)	122	110	138	120	115
Zuckermenge (g)	0.34	—	0.34	—	—

## 2) Versuch mit Desoxycholsäure.

Tage nach der Operation	11	30	17	22
Körpergewicht (g)	1780	2050	1750	2400
	bei Injektion von Adrenalin	"	" mit Desoxycholsäure	"
Blutzucker vor der Injektion (%)	0.108	0.101	0.111	0.102
Blutzucker nach Stunde	$\left\{ \begin{array}{l} 1/2 \\ 1 \\ 2 \\ 3 \\ 4 \\ 5 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.149 \\ 0.198 \\ 0.252 \\ 0.272 \\ 0.239 \\ 0.125 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.170 \\ 0.191 \\ 0.199 \\ 0.185 \\ 0.145 \\ 0.112 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0.160 \\ 0.213 \\ 0.279 \\ 0.271 \\ 0.237 \\ 0.131 \end{array} \right.$
Harnmenge (ccm)	118	124	120	154
Zuckermenge (g)	0.64	—	0.52	0.42

hervor, dass die Gallensäure die Zuckerausscheidungsschwelle herabsetzt. Nach Kawashima (1929) wird die Zuckerausscheidungsschwelle des Hundes durch die Ausschaltung der N. splanchnici in der 2. Woche nach der Operation erhöht, um später wieder bis zum präoperativen oder subnormalen Wert zurückzugehen. Auf Grund dieser Tatsachen möchte ich annehmen, dass eine ausgebliebene Adrenalinglykosurie des splachnikotomierten Kaninchens auf der durch Ausfall der sympathischen Wirkung bedingten herabgesetzten Zuckerausscheidungsschwelle beruht, weil das Adrenalin am 25–30sten Tag nach der Operation zugeführt wurde, und dass eine ausgebliebene Adrenalinglykosurie bei Injektion von Adrenalin mit Cholsäure auf der antagonistischen Funktion der Gallensäure gegen das Adrenalin und auf der die Zuckerausscheidung herabsetzenden Wirkung der Gallensäure beruht.

Aus den obenerwähnten Befunden kann man wohl schliessen, dass die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure auf der lähmenden Wirkung auf den Sympathikus beruht, da ja dadurch die Adrenalinsekretion der Nebenniere gehemmt und die Glykogenmobilisation in der Leber indirekt hemmend beeinflusst wird.

#### *IV. Einfluss der Gallensäure auf den Blutzucker bei Vagotomie.*

Zuerst wurde der Einfluss der Gallensäure auf den nüchternen Blutzucker des normalen Kaninchens, das 15–18 Stunden lang gehungert hatte, geprüft. Die Vagotomie wurde bei demselben nach Freund (1918) ausgeführt, und zwar wurden beide Vagidicht unter dem Zwerchfell am unteren Teil des Oesophagus durchschnitten. Nach der Operation war das Tier lebhaft und zeigte keine Gewichtsabnahme. Am ersten Tage nach der Operation wurde der Blutzuckergehalt bestimmt und mit dem Wert vor der Operation verglichen.

Aus der Tabelle IV a ist ersichtlich, dass der Blutzuckergehalt keine merkliche Veränderung zeigt.

Darauf wurde am 4.–33. Tage nach der Vagotomie dem Kanin-

TABELLE IV(a).

Nr.		1	2	3	4	5	6	7
vor der Vagotomie	Körpergewicht(g)	2000	2200	2320	1920	1850	2250	2070
	Blutzucker(%)	0.108	0.118	0.125	0.105	0.103	0.108	0.095
nach der Vagotomie	Körpergewicht(g)	1960	2000	2250	1880	1850	2220	1970
	Blutzucker(%)	0.107	0.109	0.116	0.108	0.109	0.105	0.095

chen, das 15–18 Stunden lang gehungert hatte, 1.0–3.0 ccm einer 1%igen Cholatlösung pro kg Körpergewicht subkutan verabreicht. Sein Blutzuckergehalt wurde in einem bestimmten Zeitintervall bestimmt und mit dem Wert vor der Operation verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV b zusammengestellt.

Aus der Tabelle IV b ist ersichtlich, dass die hypoglykämische Wirkung der Cholsäure im Vergleich zu den Werten vor der Vagotomie in den meisten Fällen keinen merklichen Unterschied aufweist. Aber bei Zufuhr einer grösseren Menge von Cholsäure tritt die hypoglykämische Wirkung stärker hervor als bei Zufuhr einer kleineren Menge, während die hypoglykämische Wirkung bei einer kleineren Menge im Vergleich zu der Kontrolle herabgesetzt gefunden wurde.

Nach den Versuchen von Taku wird die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch Atropin und Pilocarpin gehemmt, dagegen durch Kalium gesteigert. Es wurde schon erwähnt, dass die Gallensäure auf den Sympathikus lähmend wirkt. Diese Daten sprechen dafür, dass die Gallensäure bei Vagotomie durch den Ausfall der Vaguswirkung auf die antagonistisch überwiegend tonischen sympathischen Nerven lähmend wirkt, da ja der Blutzuckergehalt bei kleineren Mengen weniger herabgesetzt und bei grösseren Mengen Gallensäure stärker herabgesetzt gefunden wurde.

TABELLE IV(b).

Nr.	Körpergewicht in g	Tage nach der Vagotomie	Injizierte Cholat- menge in cem pro kg Körpergewicht	Blutzucker vor der Injektion (%)	Blutzucker nach Stunde							
					1/2	1	2	3	4	5	6	7
1 {	2000	vor	1.0	0.108	0.113	0.087	0.097	0.104	0.105	0.099	0.094	0.087
	1670	33	"	0.120	0.112	0.107	0.107	0.093	0.111	0.118	0.121	0.112
2 {	2360	vor	1.0	0.121	—	0.112	0.108	0.104	0.102	0.104	0.103	0.106
	2250	6	"	0.110	0.113	0.105	0.100	0.097	0.099	0.104	0.104	0.113
3 {	2200	vor	1.5	0.121	0.103	0.098	0.078	0.089	0.091	0.104	0.101	0.101
	2000	"	"	0.108	0.101	0.101	0.090	0.093	0.105	0.107	0.108	0.108
4 {	1800	5	"	0.098	0.099	0.101	0.099	0.088	0.085	0.094	0.089	0.094
	1980	vor	2.0	0.104	0.174	0.105	0.092	0.092	0.090	0.087	0.103	0.103
5 {	1680	6	"	0.100	0.116	0.115	0.104	0.093	0.093	0.096	0.084	0.087
	1850	vor	3.0	0.103	0.081	0.092	0.096	0.096	0.106	—	0.102	0.101
6 {	1850	6	2.0	0.097	0.094	0.093	0.083	0.091	0.089	0.089	0.103	0.099
	1700	11	3.0	0.110	0.109	0.098	0.107	0.101	—	0.105	0.123	0.115
7 {	2230	vor	3.0	0.111	0.114	0.106	0.093	0.097	0.103	0.092	0.105	0.103
	2200	4	"	0.100	0.108	0.100	0.091	0.091	0.097	0.100	0.105	0.102
7 {	2030	vor	3.0	0.117	0.108	0.106	0.090	0.088	0.104	0.104	0.109	0.110
	1890	6	"	0.105	0.100	0.090	0.080	0.071	0.069	0.084	0.086	0.087

als bei der Kontrolle. Einerseits, weil die hypoglykämische Wirkung einer kleineren Menge Gallensäure bei Vagotomie viel schwächer auftritt als vor der Operation, und andererseits, weil Kalium, welches nach Taku die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure verstärkt, im Sinne von Zondeks Behauptung durch den Parasympathikus ersetzt werden könnte, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Gallensäure auf den Parasympathikus reizend wirkt.

#### V. *Einfluss der Gallensäure auf den Zuckerstich.*

Durch die obenerwähnten Versuche wurde klargestellt, dass die Gallensäure bei ihrer hypoglykämischen Wirkung auf den Sympathikus lähmend und auf den Parasympathikus reizend wirkt, und dass sie mit dem Insulin im Kohlehydratstoffwechsel einen regulierenden Faktor darstellt, indem sie gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt.

Es wurde schon erwähnt, dass eine nervöse Erregung aus dem Zuckerzentrum einerseits unter Vermittelung der N. splanchnici zur Nebenniere gelangt, und dadurch die Adrenalinsekretin beeinflusst wird, indem das Adrenalin auf die Leber einwirkt. Andererseits erreicht die Erregung unter Vermittelung der N. splanchnici direkt die Leber. In diesem Sinne kann man annehmen, dass die nervöse Erregung durch den Zuckerstich infolge der Lähmung der Bahn der N. splanchnici herabgesetzt wird, indem sie eine herabgesetzte Hyperglykämie und Glykosurie zur Folge hat, wenn die Gallensäure auf das Zuckerzentrum einwirkt.

#### *Methodik:*

Der Zuckerstich wurde nach dem üblichen Verfahren ausgeführt, indem die Ala cinerea mit der Stichnetel verletzt wurde. Nach der Operation wurde der Blutzuckergehalt in bestimmten Zeitintervallen bestimmt, in der 7ten Stunde wurde der Harn durch Katheterisieren abgelassen und der Zuckergehalt bestimmt. Bei dem eigentlichen Versuch wurden zuerst 5.0 ccm einer 1%igen Natriumeholatlösung pro kg Körpergewicht subkutan oder von derselben Lösung 0.7–1.0 ccm pro kg Körpergewicht intravenös

TABELLE V.  
a) Kontrolle.

Nr.	1	2	3
Körpergewicht (g)	2120	2030	2250
	Blutzucker (%)	Blutzucker (%)	Blutzucker (%)
vor der Piqûre	0.114	0.112	0.105
Stunden nach Piqûre			
1	0.255	0.267	0.319
2	0.314	0.280	0.339
3	0.353	0.323	0.444
4	0.355	0.301	0.423
5	0.356	0.317	0.374
6	0.335	0.282	0.369
Harnmenge (cem)	150	61	130
Zuckermenge (g)	2.5	2.0	2.0

b) Bei subkutaner Zufuhr der Cholsäure.

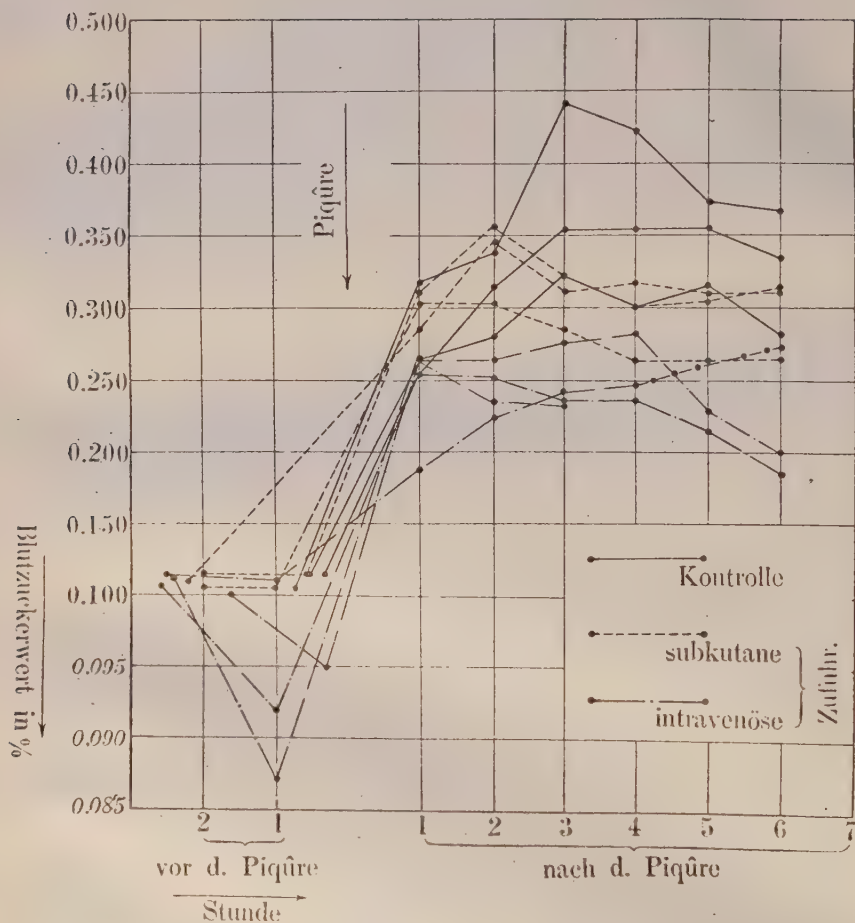
Nr.	1	2	3
Körpergewicht (g)	2270	2400	2270
Injizierte Cholatmenge in cem pro kg Körpergewicht	5.0	5.0	5.0
	Blutzucker (%)	Blutzucker (%)	Blutzucker (%)
vor der Probe	0.110	0.116	0.105
vor der Piqûre	—	0.114	0.104
Stunden nach Piqûre			
1	0.285	0.312	0.304
2	0.345	0.356	0.303
3	0.311	0.322	0.286
4	0.319	0.301	0.266
5	0.311	0.306	0.267
6	0.311	0.313	0.265
Harnmenge (cem)	160	26	120
Zuckermenge (g)	2.0	0.58	1.1
Bemerkungen	Piqûre 1 u. 5/12 Stunde nach Cholat-zufuhr ausgeführt	Piqûre 1 Stunde nach Cholat-zufuhr ausgeführt	Piqûre 2 Stunden nach Cholat-zufuhr ausgeführt

## c) Bei intravenöser Zufuhr der Cholsäure.

Nr.	1	2	3	4
Körpergewicht (g)	1970	2300	2600	2300
Injizierte Cholatmenge in ccm pro kg Körpergewicht	1.0	0.7	0.7	0.7
	Blutzucker (%)	Blutzucker (%)	Blutzucker (%)	Blutzucker (%)
vor der Probe	0.111	0.113	0.100	0.107
vor der Piqûre (1 Stunde nach Zufuhr von Cholat)	0.087	0.110	0.095	0.092
Stunden nach Piqûre	1	0.264	0.189	0.265
	2	0.239	0.221	0.267
	3	0.232	0.241	0.276
	4	gestorben	0.249	0.282
	5		0.261	0.230
	6		0.275	0.200
Harnmenge (ccm)	65	130	110	100
Zuckermenge (g)	0.58	0.44	0.41	0.42
Bemerkungen	Piqûre 2 Stunden nach Cholatzufuhr	Piqûre. 1½ Stunden nach Cholatzufuhr	Piqûre. 1¼ Stunden nach Cholatzufuhr	Piqûre 2 Stunden nach Cholatzufuhr

zugeführt; nach Ablauf von 1–2 Stunden wurde unter genau den gleichen Bedingungen wie bei der Kontrolle der Zuckerstich gemacht und der Zuckergehalt des Blutes und Harnes bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle V und in graphischer Darstellung zusammengestellt.

Aus der Tabelle V a, b, c und der graphischen Darstellung ist ersichtlich, dass die durch Zuckerstich hervortretende Hyperglykämie und Glykosurie durch subkutane Zufuhr der Gallensäure, bzw. deren intravenöser Zufuhr, im Vergleich zu der Kontrolle (Tabelle V a) bei 5 von 7 Fällen deutlich herabgesetzt gefunden



wurde.

Der Zuckerstich bewirkt natürlich stärkere oder schwächere Hyperglykämie und Glykosurie je nach dem Grad der Verletzungen. Daher habe ich den Stich vorsichtig unter genau den gleichen Bedingungen ausgeführt. Aus dem Befunde kann man wohl schliessen, dass die Gallensäure auf den Impuls aus dem Zuckerzentrum hemmend wirkt. Einerseits wirkt die Gallensäure auf

den Sympathikus und das Zuckerzentrum lähmend, indem die Adrenalinsekretion aus der Nebenniere gehemmt wird. Andererseits wirkt sie auf den Parasympathikus reizend, indem die Insulinsekretion gesteigert wird. Auf diese Weise wird der Kohlehydratstoffwechsel im Organismus durch die Gallensäure reguliert, indem die Gallensäure unter Vermittelung der beiden Nerven auf die Leber einwirkt.

Im Hinblick auf diese Tatsache kann man wohl verstehen, dass unter den Gallensteinranken die Vagotoniker vorherrschen, weil die Gallensäure durch die Stauung aus der Leber zurückresorbiert werden und im Überschuss in die Blutbahn gelangen kann. Es ist denkbar, dass der nervöse Impuls aus dem Nervenzentrum infolge der überschüssigen Gallensäure im Blut, beeinflusst wie bei der Cholämie des Stauungsikterus, in die Erscheinung tritt.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Zufuhr von Gallensäure setzt den nüchternen Blutzucker des Kaninchens herab, wie schon Misaki in seinem Versuch bewiesen hat.

Diese hypoglykämische Wirkung der Gallensäure wird durch Splanchnikotomie aufgehoben. Daraus ist zu schliessen, dass die Gallensäure auf den Sympathikus lähmend wirkt.

2. Die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure bei Adrenalinhyperglykämie wird durch Splanchnikotomie aufgehoben. Die Adrenalinglykosurie nach langem Verlauf von Splanchnikotomie wird sowohl durch Zufuhr von Gallensäure als auch ohne Zufuhr derselben aufgehoben. Das beruht auf der Herabsetzung der Zuckerausscheidungsschwelle, da die Gallensäure, nach Taku, auf die Zuckerausscheidungsschwelle herabsetzend wirkt, und die Zuckerausscheidungsschwelle durch langen Verlauf der Splanchnikotomie, nach Kawashima, herabgesetzt wird.

3. Die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure bleibt bei Zufuhr einer kleineren Menge durch Vagotomie unverändert oder wird vielmehr herabgesetzt, während sie bei einer grösseren Menge

von Gallensäure verstärkt wird. Nach den Daten und dem Befund von Zondek und Taku, dass die Nervenfunktion durch Elektrolyte ersetzt, und die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch das Kaliumion verstärkt wird, möchte ich annehmen, dass die Gallensäure auf den Parasympathikus reizend wirkt, indem der gegenseitig antagonistisch wirkende Sympathikus durch Vagotomie in einen hypertonischen Zustand versetzt wird.

4. Der nervöse Impuls aus dem Zuckerzentrum in der Medulla oblongata wird durch die Gallensäure hemmend beeinflusst.

Aus den oben erwähnten Daten kann man schliessen, dass die Gallensäure auf den nervösen Impuls aus dem Zuckerzentrum in der Medulla oblongata hemmend, auf den Sympathikus lähmend und auf den Parasympathikus reizend einwirkt, indem ihr Einfluss unter Vermittelung der beiden Nerven direkt auf die Leber oder indirekt auf die Adrenalinsekretion der Nebenniere ausgeübt wird. Auf diese Weise wird der Kohlehydratstoffwechsel im Organismus durch Gallensäure reguliert, indem die Glykogenmobilisation in der Leber und im Muskel gehemmt, und die Glykogenbildung in denselben befördert wird.

Zum Schluss möchte ich Herrn Dr. Kitayama für seine freundliche Hilfe bei der Operation der Versuchstiere meinen herzlichsten Dank aussprechen.

#### LITERATUR.

- Adlersberg, D. u. Roth, E. (1927): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol., **121**, 131.  
 Barsch, E. (1924): Kl. Wochenschr. 3 Jg, 1618.  
 Bertram, F. (1928): Deut. Arch. f. kl. Med., **158**, 76.  
 Blum, F. (1901): Deut. Arch. f. klin. Med., **71**, 146.  
 „ (1902): Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., **90**, 617.  
 Brugsch, Th. Dresel, K. u. Lewy, F. H. (1920): Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap., **21**, 358.  
 Brugsch, Th. Dresel, K. u. Lewy, F. H. (1921): Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **25**, 262.  
 Carrasco-Formiguera, R. (1922): Americ. Journ. of Physiol., **61**, 254.

- Dresel, K. (1924): Kraus-Brugschs Spez. Pathol. u. Therap. X. 3 Teil, 28.  
 Dresel, K. u. Omonskey, F. (1927): Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 55, 371.  
 Eppinger, H., Falts, W. u. Rudinger, C. (1906): Zeilschr. f. Kl. Med. 66, 1.  
 Freund, H. (1913): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol, 72, 295.  
 Freund, H. u. Marchand, F. (1914): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., 76, 324.  
 Frerichs, F. Th. (1861): Klinik. d. Leberkrankh., 1, 80.  
 Fujii, I. (1918): Tohoku-Igaku-Zasshi, 3, 67.  
 Gigon, A. (1912): Ergebnis. d. inn. Med. u. Kinderkrankh., 9, 206.  
 Hatakeyama, T. (1927): Journ. of Biochem., 8, 371.  
 „ (1929): Journ. of Biochem., 11, 273.  
 Hisamoto, J. (1928): Okayama-Igakkai-Zasshi, 467, 247.  
 Horsters, H. u. Rothmann, H. (1929): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., 142, 261.  
 Jarisch, A. (1913): Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap., 13, 520.  
 Kahn, R. H. (1909): Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., 128, 519.  
 „ (1911): Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., 140, 209.  
 Kahn, R. H. u. Starkenstein, E. (1911): Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., 139, 181.  
 Karasawa, R. (1926): Journ. of Biochem. 6, 139.  
 Kawashima, S. (1928): Journ. of Biochem., 9, 337.  
 Kobayashi, T. (1928): Journ. of Biochem., 9, 251.  
 Kraus, F. u. Zondek, S. G. (1924): Kl. Wochenschr., 3Jg, 707.  
 MacLeod, J. J. R. (1908): Americ. Journ. of Physiol., 22, 373.  
 MacLeod, J. J. R. u. Pearce, R. G. (1912): Americ. Journ. of Physiol., 29, 419.  
 Matsuo, I. (1924): Nihon-Naika-Gakkai-Zasshi, 12, 215.  
 Misaki, K. (1927): Journ. of Biochem., 8, 235.  
 Minkowski, O. (1886): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., 21, 41.  
 Murakami, K. (1928): Journ. of Biochem., 9, 261.  
 Ohara, T. (1925): Tohoku Journ. of exp. Med., 6, 213.  
 Okamura, T. (1928): Journ. of Biochem., 9, 271 u. 445.  
 Quinke, H. (1884): Virchows Arch., 95, 125.  
 Rupp, E. (1925): Zeitschr. f. d. ges. exp. Med., 44, 476.  
 Schlossmann, H. (1927): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., 121, 160.  
 Schulze, O. (1900): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., 43, 204.  
 Shimizu, K. (1924): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., 103, 52.  
 Taku, A. (1923): Journ. of Biochem., 9, 299.  
 „ (1929): Arbeit. aus d. med. Universität zu Okayama, 1, 413.  
 Waltermann, N. u. Smit, H. J. (1908): Pflügers Arch. f. d. ges.

- Physiol., 124, 198.
- Wertheimer, N. u. Battez, G. (1910): Arch. intenat. de Physiol., 9, 140 u. 363.
- Westphal, K. (1923): Zeitschr. f. kl. Med., 96, 22.
- Yamauchi, R. u. Ohta, R. (1925): Chiugai-Iji-Shimpo, 1084, 731.
- Zondek, S. G. (1922): Biochem. Zeitschr., 132, 362.
- „ (1929): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., 143, 362.
- Zondek, S. G. u. Banett, A. (1924): Zeitschr. f. d. ges. exp. Med., 43, 281.

# THE CHANGE IN THE AMOUNT OF BLOOD-CHLORINE DURING ASPHYXIATION FROM THE VIEW-POINT OF ACIDOSIS.

## Report I.

By

TAKESHI SASO.

(From the Department of Forensic Medicine, Hokkaido Imperial University.  
Director: Prof. K. Yamakami.)

(Received for publication, May 28, 1930.)

### I. INTRODUCTION.

In 1922 K. Yamakami (1922) found the new fact that in asphyxia the chlorine-content of blood shows a high value and a marked decrease of tissue-chlorine takes place. He concluded from these experimental facts that in acute asphyxia the tissue-chlorine is mobilized into blood. The author has also proved in the course of an investigation on the asphyxial-blood that the concentration of H-ions is greatly enhanced during asphyxiation (1919).

Now many authors believe in the existence of some relationship between the acidosis and the amount of blood-chlorine. In general the hyperchlorinemia has been observed in acidosis, but sometimes the hypochlorinemia has reversely been found. According to Heilmeyer (1927) the hypochlorinemia in plasma is of great value as an indicator of acidosis, and Schwartz and Schmid (1928) took the increase of corpuscular-chlorine for a very valuable indication of acidosis.

Working on the problem of asphyxial hyperchlorinemia, T. Kubo and T. Mitsui (1928) have proved that in acute asphyxia the amount of chlorine increases constantly in erythrocytes, while it decreases in plasma, the content of chlorine in the whole blood showing always a hyperchlorinemic value. They concluded from these experimental results that the chlorine interchange or the

so-called chloride-shift\* take place in the blood of asphyxiated animals as an effort of living organism to control the pH of plasma.

Though there are some authors who insist upon the occurrence of alkalosis during asphyxiation many authors (Collip, 1927; Hall, 1926; Fritz, 1926; Gesell, 1926; Rittmann, 1927; Lehnhart, 1920; Koehler, 1925) assert reversely the production of acidosis by asphyxiation or  $O_2$ -deficiency, and I could confirm with M. Yoshida (1929) the results obtained by K. Yamakami and these many authors, that is the definite increase in the concentration of H-ions in asphyxial-blood.

I have undertaken to elucidate the relationship between acidosis and hyperchloraemia in asphyxia, and the present work has been done as a preliminary experiment for the purpose of determining the change in the amount of chlorine in the whole blood as well as in red-cells and plasma during acute- and prolonged asphyxiation.

## II. EXPERIMENT.

As experimental animals, rabbits were employed, and the blood samples were always taken by heart-puncture. The animal was fixed on the back on a table and then control blood (the blood before asphyxia) was first taken by heart-puncture with a hypodermic needle, employing a small quantity of powdered potassium oxalate as anticoagulant. Then the trachia of the animal was suddenly and tightly pressed by the hand manually or strangled with a gum-tube so that the animal could not breathe at all. In some cases (No. 82-84) the trachia was operatively exposed and carefully separated from the nerves and blood-vessels, avoiding the loss of blood.

The exposed trachia was pinched with Kocher's Pincett by an assistant. In this way, asphyxia could be produced without pressing the nerves and blood-vessels of the neck, avoiding the influences upon the amount of blood constituents from these sources.

\* See Wesselow's Chemistry of the Blood. p. 50.

The animal generally died from asphyxiation in this way within 3.5 to 5 minutes. The death caused in this way will later be called "acute asphyxia". As soon as the animal died, the heart-blood was taken with a hypodermic syringe as fast as possible.

The determination of chlorine in the blood sample in all cases was carried out by the method of Rusznyak (1921). The results are shown in table I.

As will be seen in table I, in all cases of acute asphyxia, the

TABLE I.

		Amount of Cl expressed in ClNa per 100cc blood before death	Amount of NaCl after death	Increase or decrease	Minutes elapsed after death till taking blood sample
No. 61	2000 { W. B.	400.4 mg.	476.7 mg.	+ 76.3	4 minutes
	P.	476.7	488.4	+ 11.7	
No. 51	2100 { W. B.	450.4	473.8	+ 23.4	10-12
	P.	526.5	514.8	- 11.8	
No. 54	2500 { W. B.	488.4	523.5	+ 35.1	5
	P.	529.4	552.8	+ 23.4	
No. 55	2400 { W. B.	529.2	576.7	+117.5	8-11
	P.	511.8	506.0	- 5.8	
No. 57	2300 { W. B.	456.3	491.4	+ 35.1	10-12
	P.	544.0	544.0	0	
No. 58	2000 { W. B.	427.0	456.3	+ 29.3	8.2
	P.	485.5	497.2	+ 11.7	
No. 82	2600 { W. B.	456.3	490.9	+ 34.6	10
	P.	519.2	526.5	+ 7.3	
No. 83	2530 { W. B.	421.2	456.0	+ 34.8	6
	P.	491.4	526.5	+ 35.1	
No. 84	2600 { W. B.	427.0	573.8	+ 46.8	12.5
	P.	555.7	524.0	- 13.7	
No. 85	3000 { W. B.	468.0	514.8	+ 46.8	5
	P.	512.6	520.6	+ 8.0	

W.B. Whole blood.

P. Plasma

chlorine-content of the whole blood increased without exception and in the majority of cases the plasma-chlorine also increased, while in a few cases (No. 51, 55, 84) the diminution of plasma-chlorine was observed. The decrease of plasma-chlorine generally occurred when the blood sample was taken somewhat late after death, for example, in No. 51, the blood sample was taken 10 to 12 minutes after death, while in other cases only 4 to 8 minutes elapsed after death until the heart was punctured.

To settle the question whether the length of the interval between the death and the collection of blood sample has some influence upon the amount of plasma-chlorine, further precise experiments were performed. The animal was fixed on the back on the table as in the way described above, and the control blood sample was taken by heart-puncture; then the needle was left as it was, the loss of blood through the remaining needle being avoided by a clear finger-tip. And then the neck or the exposed trachia of the animal was pressed down. From the beginning of asphyxiation a series of blood samples (2-3 cc. each) were taken from the heart at intervals of one to a few minutes through the remaining needle. The amount of chlorine in each sample was determined with whole blood as well as with plasma. The results are shown in table II and graphically in Chart I.

Chart I

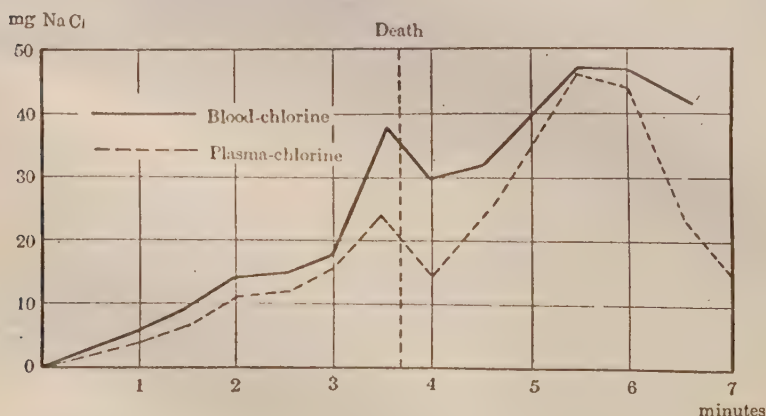


TABLE II.

No. 58 2000	before asphyxia		2,5 minutes from the beginning of asphyxia	animal died in 3,5 minutes	8 minutes from the beginning of asphyxia	
	W. B.	427,0	448,6 + 21,6	471,2 + 44,2	456,3 + 29,2	
No. 59 2100	before asphyxia		2 minutes from the beginning of asphyxia	animal died in 4 minutes	5,5 minutes from the beginning of asphyxia	11 minutes
	P.	485,5	503,1 + 17,6	561,6 + 3,0	520,6 + 35,1	497,2 + 11,7
No. 50 2400	before asphyxia		1 minute from the beginning of asphyxia	1,5 minutes	2,5 minutes	3 minutes
	W. B.	391,9	391,9 ± 0	403,8 + 11,9	409,5 + 17,6	409,5 + 17,6
No. 50 2400	before asphyxia		1 minute from the beginning of asphyxia	1,5 minutes	2,5 minutes	3 minutes
	P.	408,0	470,9 + 2,9	470,9 + 2,9	473,8 + 5,8	482,6 + 14,6
No. 50 2400	before asphyxia		1 minute from the beginning of asphyxia	1,5 minutes	2,5 minutes	3 minutes
	W. B.	391,9	391,9 ± 0	403,8 + 11,9	409,5 + 17,6	409,5 + 17,6
No. 50 2400	before asphyxia		1 minute from the beginning of asphyxia	1,5 minutes	2,5 minutes	3 minutes
	P.	408,0	470,9 + 2,9	470,9 + 2,9	473,8 + 5,8	482,6 + 14,6



From these results it may be clearly demonstrated that in the majority of cases of acute asphyxia the chlorine in plasma obviously increases as in the whole blood, namely the chlorine-content of plasma increases appreciably within about two minutes from the beginning of the asphyxiation and reaches its maximum just at the moment of death. It gradually decreases thereafter and becomes subnormal, at last, though the chlorine-content in the whole blood remains in a hyperchloraemic state longer than that of the plasma after death.

The chlorine content of plasma in acute asphyxia thus varies according to the time at which the blood sample is taken. And the subnormal lowering of the value of plasma-chlorine is nothing but a postmortem phenomenon; it is never found before the death of an animal.

In the other series of experiments, asphyxia was brought about by another method, namely the rabbits were put into a vial having a capacity of 12000cc. and closed up air tight. The animal in the vial expired within 2 to 3 hours, generally sooner in summer, and later in winter. The asphyxia produced in this manner will be designated in this paper as "prolonged asphyxia".

The results obtained in this sort of experiment are given in table III.

In almost all cases of prolonged-asphyxia, except No. 69, the chlorine content of whole blood showed a constant increase, as in the cases of acute-asphyxia, but on the contrary, without exceptions, the plasma-chlorine decreased. The chlorine-reduction in whole blood was accidentally found in prolonged-asphyxia too (No. 69). The change in the amount of chlorine in the prolonged-asphyxia is mostly not so distinct as that in acute cases, neither in blood nor in plasma.

It is interesting and important to decide the question whether the decrease of plasma-chlorine in prolonged-asphyxia is a post-mortem phenomenon, as in acute cases or not.

To clear up this question, I have studied the change in the

TABLE III.

		before asphyxia	after death	Increase or decrease	Minutes until death from the beginning of asphyxia
No. 52	1200	W. B. 423.9 P. 485.5	438.7 465.0	+ 5.8 - 20.5	180 minutes
No. 53	2500	W. B. 465.0 P. 532.3	470.9 506.0	+ 5.9 - 26.3	140
No. 65	2300	W. B. 409.5 P. 508.9	427.0 468.0	+ 17.5 - 40.9	130
No. 66	2300	W. B. 432.9 P. 532.3	450.4 514.8	+ 17.5 - 17.5	140
No. 67	2300	W. B. 427.0 P. 520.6	444.6 497.2	+ 17.6 - 23.4	115
No. 68	2300	W. B. 403.6 P. 514.8	444.6 485.5	+ 41.0 - 29.3	105
No. 69	2300	W. B. 427.0 P. 508.9	409.5 444.6	- 17.5 - 64.3	104
No. 70	2600	W. B. 409.5 P. 514.8	423.9 461.1	+ 23.4 - 52.7	105

W.B. Whole blood

P. Plasma

amount of chlorine in the course of prolonged-asphyxiation. As the experiments with animals in a vial were unfavourable for this purpose, two other methods were applied; that is, the method of artificial-pneumothorax and that with a gumsack. In the former method, animals were asphyxiated slowly by introducing air into the pleural-cavity, while in the latter, they were suffocated by covering their heads with thin gumsacks of about 4000 cc. cavity, fastened tightly around the neck. By these methods animals, could be asphyxiated in any desired duration of time. The results are given in table IV and Charts II and III.

As will be noticed in the tables given, the results are not uniform in the cases of prolonged-asphyxia by the artificial-

TABLE IV.

No. 71 2500	W. B.	before asphyxia	20 minutes from the beginning of asphyxia	40 minutes	animal died in 60 minutes
	P.				
		397,8	397,8 ± 0	427,0 + 29,2	432,9 + 35,1
		456,3	456,3 ± 0	485,5 + 29,2	468,0 + 11,7

No. 72 2900	W. B.	before asphyxia	60 minutes from the beginning of asphyxia	80 minutes	85 minutes	100 minutes	animal died in 110 minutes
	P.						
		397,8	374,4 - 23,4	380,2 - 17,6	397,8 ± 0	403,6 + 5,6	421,2 + 23,4
		462,1	450,4 - 11,7	438,7 - 23,4	456,4 - 5,7	479,7 + 17,6	479,7 + 17,6

No. 73 1150	W. B.	before asphyxia	20 minutes from the beginning of asphyxia	27 minutes	animal died in 36 minutes
	P.				
		421,2	456,3 + 35,1	473,8 + 52,6	497,2 + 76,0
		479,7	520,6 + 40,9	491,4 + 11,7	503,1 + 22,4

TABLE IV. (continued)

		before asphyxia	20 minutes from the beginning of asphyxia	animal died in 30 minutes	35 minutes from the beginning of asphyxia	40 minutes	45 minutes
No. 74 2700	W. B.	409,5	403,6 - 5,9	437,0 +17,5	397,8 -17,5	386,1 -23,4	380,2 -29,3
	P.	514,8	497,2 -17,6	536,5 +11,7	479,7 -35,1	450,4 -64,4	438,7 -76,2
		before asphyxia	20 minutes from the beginning of asphyxia	animal died in 42 minutes	60 minutes from the beginning of asphyxia	85 minutes	90 minutes
No. 75 2250	W. B.	395,6	383,4 -12,2	407,3 +11,7	387,2 - 8,4	375,9 -19,7	371,9 -23,7
	P.	504,1	479,7 -24,4	508,9 + 4,8	491,4 -12,7	473,8 -30,3	450,4 -53,7
		before asphyxia	10 minutes from the beginning of asphyxia	20 minutes	animal died in 30 minute	32 minutes from the beginning of asphyxia	42 minutes
No. 76 2600	W. B.	397,8	391,9 - 5,9	386,1 -11,7	409,5 +11,7	397,8 ± 0	386,1 -11,7
	P.	479,7	462,1 -17,6	462,1 -17,6	470,4 - 9,3	450,4 -29,3	432,9 -46,8
W.B. Whole blood		P.	Plasma				

pneumothorax. In some of the cases, the amount of chlorine increases, gradually and steadily, either in whole blood or in plasma from the beginning of asphyxiation until the death of the animals, just in the same manner as in the cases of acute-asphyxia (No. 71, 73); while in the other there appears a remarkable initial fall in the chlorine-value of whole blood as well as in plasma. After the initial fall, the chlorine-value rises again, towards the end of asphyxia, until it becomes higher than normal if the animal does not die before it has reached the normal level, as in the case of No. 76.

In prolonged-asphyxia caused by artificial-pneumothorax, however, the hyperchloraemia can always be observed during the asphyxiation, at least towards the moment of death, even when the chlorine-content of plasma is subnormal.

Chart II

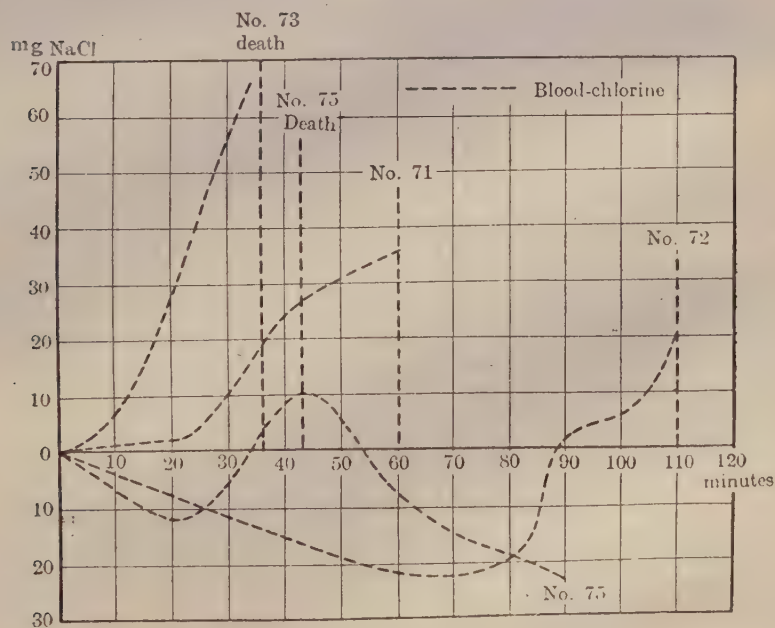
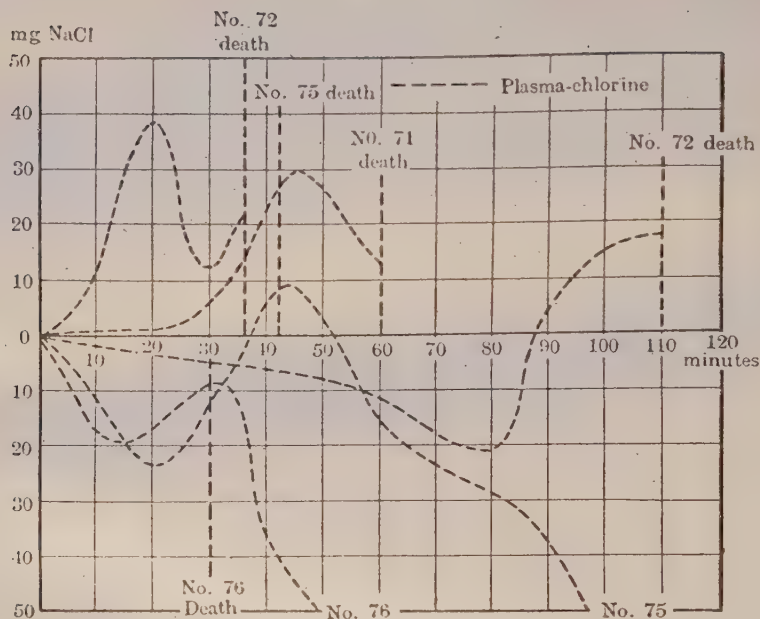


Chart III



What caused the chlorine-decrease in blood at the beginning of asphyxiation produced by pneumothorax?

The disturbance of gaseous-exchange caused by  $O_2$ -deficiency in the atmospheric air or by retrenchment of the respiring surface of the lung through such a cause as pneumothorax, may be compensated to a certain extent by hyperpnoe. According to the experiment of Fraser and his collaborator (1921) the most remarkable hyper-ventilation may be observed when the air breathed contains 8 percent  $O_2$ . Gesell (1925) observed a remarkable hyper-ventilation caused by reducing  $O_2$ -tension in the air or by stenosis of the air-passages. Lenhart (1920) could demonstrate that a severe hyper-ventilation is produced by pneumothorax.

It has been generally recognized by many authors that, owing to the hyperventilation,  $CO_2$  is liberated excessively from the blood,

so that the ratio of  $\text{CO}_2$  to  $\text{CO}_3\text{HNa}$  can not be kept in equilibrium, with the consequence that the blood reaction tends to the alkali-side Haggard, Howard and Henderson, 1920; Winterstein, 1921, Ege, Rich and Henriques, 1926; Duzar, 1925).

Alkalosis can be produced also when the air breathed contains too much CO (Davies, Haldane and Kennaway, 1920).

According to the investigation of Gyorgy and his collaborators (1925), infants are in the condition of compensative alkalosis through physiological hyperventilation, especially when they howl.

On the other hand some authors observed that hyperventilation may sometimes cause acidosis (Lenhart, 1920; Fritz, 1927).

Dautrebrand (1926) demonstrated that arbitrary hyperventilation causes alkalosis, while the inspiring of air containing much  $\text{CO}_2$  produces acidosis. Gesell and his collaborators (1926) showed very interesting experimental facts, that the inspiring of air containing 4 percent  $\text{O}_2$  for a short time makes blood more alkaline (0.1 to 0.2 pH), while acidosis is manifest if it lasts too long. Koehler (1925) demonstrated that if animals gradually run short of  $\text{O}_2$  in the respiratory changer, the primary alkalosis due to hyperventilation occurs first, and then after a long period an extreme secondary acidosis (pH 6.7) takes place, owing to the lack of  $\text{O}_2$ .

From the experimental results of these investigators it may be concluded that  $\text{O}_2$ -deficiency or  $\text{CO}_2$ -excess in the air causes either alkalosis or acidosis. Above all, the experiments of Koehler and Dautrebrand seem to prove definitely that the  $\text{O}_2$ -deficiency or  $\text{CO}_2$ -excess in the air causes alkalosis by hyperventilation at first, and then acidosis.

It is probable that even though  $\text{O}_2$  in the air has become scarce, the acidosis may not yet take place as long as the  $\text{O}_2$ -deficiency in the inspired air breathed can be compensated by hyperventilation and the  $\text{CO}_2$ -tension in the air may be lower than that of blood, on the contrary alkalosis may be produced by the excessive liberation of  $\text{CO}_2$  from the blood by compensating hyperventilation. When

it has become impossible for the hyperventilation to compensate the  $O_2$ -deficiency in the air any more, the blood-alkali will be exhausted to neutralize the excessive  $CO_2$  and other acid produced by  $O_2$ -deficit, and thus acidosis will manifest itself.

As many authors have proved already, alkalosis generally results in hypochloraemia, and I could confirm it too.

Sumpson and his collaborators (1928) demonstrated that when the overbreathing is continued for over 30 minutes, the elimination of chloride in the urine increases. Though Gollwitzer-Meier (1925) has reported a case of hyperventilation accompanied by hyperchloremia, his observation was made at 35 minutes after the beginning of hyperventilation.

According to these investigators and my experiment it can certainly be admitted that the over-breathing, resulting from  $O_2$ -deficiency or  $CO_2$ -inspiring is capable of causing alkalosis and accordingly the chlorine-decrease in blood.

As the overbreathing due to the artificial-pneumothorax must essentially be similar to that owing to the  $O_2$ -deficiency, the alkalosis may also be produced by pneumothorax in my experiment. From the results based on the experimental results of these investigators described above, it may be explained that the chlorine-reduction in both blood and plasma at the beginning of asphyxiation produced by pneumothorax in my experiments results from the hyperventilation-alkalosis.

The change in the amount of chlorine in whole blood and plasma in case of prolonged-asphyxia produced by means of pneumothorax is quite the same as in the case of acute-asphyxia, except for the above described initial fall. Therefore the decrease of plasma-chlorine, which is constantly found in prolonged-asphyxial blood and very often in acute-asphyxial blood after death, may be different from the initial fall of the chlorine-value of plasma, caused by pneumothorax-asphyxia.

When asphyxia is produced by the gum-sack-method the change in amount of chlorine in blood and plasma is generally uniform as

table V shows. In the earlier stage (in about 10 minutes) the chlorine-content shows a temporary high value in both blood and plasma; then the content of chlorine in plasma is alone lowered and finally becomes subnorm before death, while chlorine in the whole blood continues to increase gradually until the animal dies, though a slight temporary decrease (probably owing to hyper-ventilation) some times occurs within about 15–20 minutes from the start of experiment. If the animal, however, dies in a relative short time, the change in the amount of chlorine is quite the same as in the case of acute-asphyxia (No. 81).

In short, the results of my experiment described above, show the facts that, if animals are asphyxiated to death within about 50 minutes, the amount of chlorine in the whole blood continuously increases till the end of the animals, while the amount of plasma-chlorine increases only at the beginning of asphyxiation (in about 10 to 15 minutes). It decreases thereafter continuously and shows a subnormal value already before the animal dies. This is a point that differs from the cases of the acute-asphyxis, where the diminution of chlorine in plasma takes place only as a postmortem phenomenon.

As I have so far determined the change in the amount of chlorine in various forms of asphyxia, I have next endeavoured to solve the question as to the cause of asphyxial hyperchloraemia. I have tried first to decide the question, from which components of blood the chlorine-increment of whole blood results?

There are many possibilities which must be taken into consideration to solve this question. The increase of plasma-chlorine, or that of erythrocytes-chlorine, or both of them can of course, independently from each other, result in manifestation of hyperchloremia. Moreover, not only these facts, but other facts such as the increase in the relative volume of plasma may cause the increase in the amount of blood-chlorine without any of the above mentioned facts, because, as many authors have proved, red-cells generally contain less chlorine than plasma (Börminger, 1921;

TABLE V.

		before asphyxia	9,5 minutes from the beginning of asphyxia	20 minutes	30 minutes	38 minutes	45 minutes	animal died in 56 minutes
No. 80 2350	W. B.	427,0	450,4 +23,4	432,5 + 5,5	438,7 +11,7	438,7 +11,7	444,6 +17,6	438,7 +11,7
	P.	520,6	532,3 +11,7	526,5 + 5,9	520,6 ± 0	514,8 - 5,8	503,1 -17,5	491,4 -29,2

		before asphyxia	10 minutes from the beginning of asphyxia	animal died in 22 minutes
No. 81 2200	W. B.	359,3	368,5 + 9,2	374,4 +15,1
	P.	468,0	479,7 +11,7	473,8 + 5,8

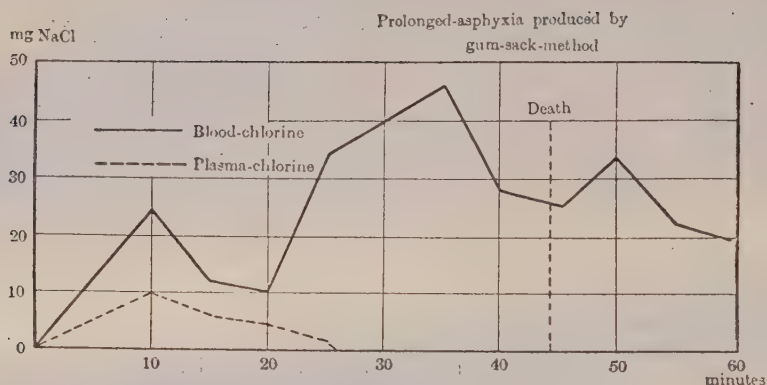
		before asphyxia	11 minutes from the beginning of asphyxia	21 minutes	30 minutes	animal died in 38 minutes
No. 82 2900	W. B.	438,7	468,0 +29,3	450,4 +11,7	444,6 + 5,6	444,6 + 5,9
	P.	526,5	532,3 +15,8	505,9 -20,6	514,8 -11,7	514,8 -11,7

TABLE V. (continued)

TABLE V. (continued)

		before asphyxia	15 minutes from the beginning of asphyxia	30 minutes	animal died in 47 minutes	55 minutes from the beginning of asphyxia	
No. 77 2800	W. B.	415.3	427.0 + 11.7	432.5 + 17.2	462.1 + 46.8	444.6 + 29.3	
	P.	520.6	526.5 + 5.9	508.9 - 11.7	508.9 - 11.7	494.2 - 26.4	
		before asphyxia	10 minutes from the beginning of asphyxia	24 minutes	35 minutes	animal died in 46 minutes	48 minutes
No. 78 2800	W. B.	394.9	444.6 + 49.7	438.7 + 33.8	450.4 + 55.5	444.6 + 49.7	456.3 + 61.4
	P.	497.2	508.9 + 11.7	497.2 ± 0	489.2 - 7.6	485.5 - 11.7	485.5 - 11.7
		before asphyxia	10 minutes from the beginning of asphyxia	25 minutes	35 minutes	animal died in 42 minutes	49 minutes from the beginning of asphyxia
No. 79 2400	W. B.	438.7	462.1 + 23.4	479.2 + 40.5	479.2 + 40.5	473.8 + 35.1	473.8 + 35.1
	P.	526.5	544.0 + 17.5	532.3 + 5.8	514.8 - 11.7	503.1 - 23.4	497.2 - 29.3
W. B. Whole blood		P. Plasma					

Chart IV.



Creveld, 1921; Daubrebande, 1922) or no chlorine (Falta and Richter Quittner, 1919, Dische, 1922).

Now as to the amount of red-cells-chlorine, in the acute asphyxia Kubo and Mitsui have already demonstrated an appreciable increase by estimating chlorine directly with red-cells, and I could confirm their results.

Their experiments, however, were limited to the chlorine-estimation with the red-cells before and after asphyxia, but not with the red-cells contained in a given volume of whole blood.

If the amount of red-cells in a given volume of whole blood is extremely reduced by asphyxiation, the chlorine-value of red-cells in the same volume of asphyxial blood may decrease even though the percentage of red-cells-chlorine has increased.

It is therefore, necessary to estimate directly the chlorine-content of the red-cells contained in a given volume of whole blood before and after asphyxia. Regarding the direct estimation of red-cells-chlorine, A. Eugster (1928) showed the fact that, when the red-cells are washed with isotonic glucose-solution in order to liberate them from the plasma, the chlorine-value in the red-cells becomes very uniform. He, therefore, analyzed the red-cells directly without washing with isotonic solution. And according

to his observation the chlorine-value obtained in this manner is somewhat higher than the normal value, owing to the plasma accompanied by the red-cells, but the increase of chlor-value in red-cells obtained without washing is always very slight, at most only 10 percent of obtained total-value of chlorine in red-cells.

I have observed very often the same fact as in Eugster's experiment; especially when the small amount of blood, such as 0.1 cc, is washed two or three times with the isotonic glucose solution, the chlorine-content of red-cells become very slight and un-uniform, sometimes, even zero. Therefore I have estimated the chlorine-content of red-cells in a given volume of whole blood according to Eugster's method. The results are shown in table VI.

TABLE VI.

mg. ClNa of red cells in 100 cc. blood  
in prolonged asphyxia.

No:	before asphyxia	after asphyxia	minutes from the beginning of asphyxia until blood taking
2600	129,6	199,8	17
2400	143,8	167,3	15
1900	111,1	141,1	20
2200	119,3	154,4	12
2000	148,5	203,8	22
2800	155,6	187,2	19
2400	112,6	145,7	18
2500	140,4	179,7	10

mg. ClNa of red cells in 100 cc. blood  
in acute asphyxia.

No.	before asphyxia	after asphyxia
2600	131,0	182,5
2300	118,2	186,4
2100	149,6	191,6
2300	136,4	203,8
2200	134,4	177,8
2000	154,7	204,2
2100	198,8	228,1
2000	132,6	191,2

As will be seen in table VI, in acute asphyxia, the amount of chlorine in red-cells contained in a given volume of blood constantly increases without regard to the change in the amount of red-cells, and in prolonged-asphyxia the amount of chlorine in red-cells in the early stage already shows also an appreciable increase.

TABLE VII.

R. C. red-cells H. B. hemoglobin		before asphyxia	after death
No. 83	2350	R. C. 640,0000	616,8000
		H. B. 57	59
No. 84	2600	R. C. 692,0000	560,0000
		H. B. 72	76
No. 85	3000	R. C. 451,5000	347,2000
		H. B. 47	44
No. 87	2300	R. C. 567,1875	456,5625
		H. B. 47	56
No. 88	2600	R. C. 736,5000	697,5000
		H. B. 78	78
No. 89	2200	R. C. 776,8000	648,4000
		H. B. 75	76
No. 90	2100	R. C. 730,6000	599,6200
		H. B. 87	84
No. 1	600	R. C. 770,3000	603,1000
		H. B. 97	97
No. 2	800	R. C. 665,0000	659,0000
		H. B. 96	99
No. 3	700	R. C. 782,5000	695,6000
		H. B. 97	98
No. 4	750	R. C. 355,0000	325,0000
		H. B. 54	53
No. 5	750	R. C. 520,0000	500,0000
		H. B. 77	76
No. 6	800	R. C. 443,1000	323,4000
		H. B. 69	59

It is a well known fact that plasma-chlorine can easily emigrate into erythrocytes in higher tension of  $\text{CO}_2$  (Creveld, 1921; Daubrebande, 1922; Fridrica, 1920; Hamburger, 1891; Van Slyke and Cullen, 1917). The increase in the amount of erythrocytes-chlor in asphyxial blood may therefore be attributed to this fact.

Regarding the amount of plasma-chlorine, Kubo and Mitsui have reported a decrease in the acute-asphyxia, but as shown in my experiment, it is only a postmortem phenomenon and the plasma-chlorine increases without exception till the death of animals in the case of acute-asphyxia. Even when both plasma-chlorine and red-cells-chlorine increase, hyperchloraemia is not to be necessarily expected, but they may accompany hypochloraemia if the relative volume of plasma reduces. Theoretically considered, it is very probable that plasma-volume may be reduced in the acute-asphyxia owing to the dehydration of blood caused by the enhancement of osmotic pressure in the tissue. In fact, a few authors such as Hall (1926), Collip (1927), insist upon the decrease in the blood-volume by dehydration of plasma with an increase in the various blood constituents during asphyxiation, though their experiments belong to "prolonged-asphyxia". It is therefore very desirable to study the numerical change of erythrocytes as well as the change in the volume of plasma during acute asphyxia.

In prolonged-asphyxia, the amount of chlorine both in whole blood and plasma increases in the earlier period, while, in the later stage, the plasma-chlorine decreases constantly in spite of the increase of chlorine in whole blood. If the ratio of plasma-volume to that of red-cells remains unchanged in this case, the hyperchloraemia must be attributed to the increment of chlorine in red-cells. But many authors have shown the fact that the number of red-cells increase generally during asphyxiation or in  $\text{O}_2$ -deficiency, with the consequence that a decrease in the relative-volume of plasma must be expected, and accordingly the hypo-

chloraemia is sure to occur unless the increase of erythrocytes-chlorine is so remarkable that it covers the decrease of plasma-chlorine due to the decrease in the relative volume of plasma. The necessity of studying the numerical change of red-cells and the changes in the plasma-volume arises here again in order to solve the problem. In the present paper, only the results of experiments in which the numerical change of erythrocytes has been studied, will be described.

In my experiments, a very interesting fact has been elucidated. As has been discussed above, there is a great deal of theoretical reason to expect that in asphyxia, especially in acute-asphyxia, a release of water from the blood must take place with the consequence that various blood constituents increase in their concentration. And in fact many authors have already shown that the number of red-cells really increases during asphyxiation (Izquierodo, 1928).

My experiments, however, have shown that this is the case only in prolonged-asphyxia, and that in acute-asphyxia, the erythrocytes do decrease in number in nearly all cases as will be seen in given table VII. From the results of experiments made on the numerical change of red-cells, therefore, the deduction must be made that not the diminution of plasma-volume due to the release of water from blood, but increase of plasma-volume occurs in the case of acute-asphyxia, because the distraction of so many erythrocytes in such a short time as 3-5 minutes is not conceivable here. How to explicate this apparent paradox which exists between the results of theoretical considerations and those of experiments, will be discussed in the next paper, after the change in the plasma-volume has been thoroughly investigated in another way.

As to the hemoglobin-content, only a slight increase or decrease was found, no constant notable alteration was demonstrated in acute-asphyxia; however, when pronounced reduction of red-cells took place the hemoglobin-content showed somewhat less value than normal. In prolonged-asphyxia also, in nearly all cases, no remark-

able variation of of hemoglobin content was found.

As to the numerical change of the red-cells in asphyxia a precise observation will be reported on, further, again.

From the results with the blood count we may point out the following fact; in acute-asphyxia, the chlorine-increase in the whole blood is due to the chlorine-increase in red-cells, in plasma and to the relative enlargement of plasma-volume, resulting from the numerical diminution of red-cells. And the hyperchloreamia in the earlier period of prolonged-asphyxia is due to the increase of chlorine in red-cells and plasma, but in the later stage, it is due to the increase of chlorine in red-cells alone, because the amount of chlorine, as well as the relative-volume, decreases in plasma.

### III. SUMMARY.

1. In acute-asphyxia the amount of chlorine in the whole blood begins to increase in an appreciable amount already in about one minute, and continues to increase steadily till the death of animals.

2. In acute-asphyxia the amount of chlorine, in the plasma increases in the same manner, just as in the whole blood, the decrease of plasma-chlorine, which is very often found in animals dying from acute-asphyxia, is a postmortem phenomenon. The chlorine-decrease in plasma can not be found in any cases in the life-time of animals during acute-suffocation.

3. In the prolonged-asphyxia the chlorine in the whole blood increases gradually and reaches its maximum in 10 to 20 minutes; it remains thereafter without notable variation up to the death of the animals. When the chlorine-decrease in plasma becomes too extreme, however, the amount of chlorine in the whole blood is somewhat reduced though it generally shows hyperchloremic value to the last.

4. In the prolonged-asphyxia the amount of chlorine in plasma increases at the beginning of asphyxiation up to 10 to 20 minutes, and then decreases by degrees, finally showing a subnormal

value before death. If, however, the experimental animal has died within about 30 minutes, the results are similar to those in acute-asphyxia.

5. An initial fall of the amount of chlorine in blood and plasma is often observed in the earlier stage of prolonged-asphyxia, especially produced by pneumothorax. This may be taken as the result of hyper-ventilations-alkalosis.

6. In the acute-asphyxia, the chlorine-increase in the whole blood resulted from the following three factors, namely chlorine-increase in red-cells, chlorine increase in plasma, relative enlargement of plasma-volume, due to numerical reduction of red-cells.

7. In the prolonged-asphyxia, the chlorine-increase in whole blood in the earlier period is due to the chlorine-increase in red-cells and in plasma, but in the later stage, the hyperchloraemia results from the chlorine-increase in red-cells alone.

8. Hypo-globulia happens constantly in acute-asphyxia.

9. Poly-globulia happens constantly in prolonged-asphyxia.

10. In the acute-asphyxia the hemoglobin-content of blood shows no definite change, and in prolonged-asphyxia the hemoglobin-content shows nearly no notable alteration.

#### REFERENCES

- Bönniger (1921): *Biochem. Zeitschr.*, **122**, 258.  
 Collip (1927): *Journ. of Biol. Chem.*, **74**, 28.  
 Creveld (1921): *Biochem. Zeitschr.*, **123**, 304.  
 Daubrebande (1922): *Journ. of Physiol.*, **57**, 36.  
 Dautrebande (1926): *Congress Central Blatt of Ges. inn. Med.*, **43**, 582.  
 Davies, Haldane and Kennaway (1920): *Journ. of Physiol.*, **54**, 32.  
 Dische (1922): *Biochem. Zeitschr.*, **131**, 296.  
 Duzar (1925): *Zeitschr. f. d. Ges. Exp. Med.*, **45**, 708.  
 Ege, Rich und Henriques Vald (1926): *Biochem. Zeitschr.*, **176**, 441.  
 Eugster, A. (1928): *Zeitschr. f. Klinisch. Med.*, **107**, 224.  
 Falta und Richter-Quittner (1919): *Biochem. Zeitschr.*, **101**, 148.  
 Fraser (1921): *Americ. Journ. of Physiol.*, **55**, 2, 159.

- Fridrica (1920): *Journ. of Biol. Chem.*, **42**, 243.
- Fritz (1926): *Biochem. Zeitschr.*, **170**, 236.
- Fritz, Gusztav (1927): *Kongress Zentralblatt f. gesam. inn. Med.*, **45**, 440.
- Gesell (1926): *Proc. of the Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, **24**, 260.
- Gesell, Robert and Hertzman (1925): *Proc. of Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, **22**, 298.
- Gollwitzer-Meier (1925): *Bioch. Zeitschr.*, **160**, 433.
- György (1925): *Zeitschr. f. Kinderheil*, **41**, 700.
- 440.
- Haggard, Howard and Henderson (1920): *Journ. of Biol. Chem.*, **43**, 15.
- Hall (1926): *Journ. of Biol. Chem.*, **67**, 549.
- Hamburger (1891): *Zeitschr. f. Biolg.*, **28**, 405.
- Heilmeyer (1927): *Deutsch. Arch. f. Klini. Med.*, **156**, 200.
- Izquierodo (1928): *Amer. Journ. of Physiol.*, **86**, 145.
- Koehler (1925): *Journ. of Biol. Chem.*, **64**, 2, 13.
- Kubo, T. and Mitsui, T. (1928): *Japan Medical World*, **8**, 10, 1.
- Lenhart (1920): *Arch. of Surg.*, **1**, 2, 336.
- Rittmann (1927): *Zeitschr. f. d. Ges. Exp. Med.*, **57**, 262.
- Rusznayak (1921): *Biochem. Zeitschr.*, **114**, 23.
- 193.
- Schwartz, A. and Schmid, F. (1928): *Physiological Abstracts*, **13**, 630.
- Sumpson (1928): *Journ. of Biol. Chem.*, **76**, 1, 171.
- Van Slyke and Cutten (1917): *Journ. of Biolg. Chem.*, **30**, 289.
- Winterstein, Haus (1921): *Pflüger's Arch. f. d. Ges. Physiol.*, **187**, 293.
- Yamakami, K. (1922): *Tohoku Journ. of Exp. Med.*, **3**, 352.
- Yamakami, K. (1919): *American Journ. of Physiol.*, **50**, 2, 177.
- Yoshida, M. and Saso, T. (1929): *Hikkaido Igaku*, **9**, 1263 (Japanese).



## ON THE CYSTIN AND CYSTEIN CONTENTS OF HUMAN HAIR.

By

TETSUTARO TADOKORO AND HANAKO UGAMI.

*(From the Biochemical Laboratory, Faculty of Science, Hokkaido  
Imperial University, Sapporo.)*

(Received for publication, June 15, 1930.)

Biological studies (Danforth, 1925) of human hair have been reported by many authors but chemical studies have been limited only to the general composition of hair and the elemental composition of keratine (Hammersten, 1926). Recently, Hopkins (1925) reported the important physiological function of glutathion, found in living cells and tissues, which has an intimate relation to the cystin and cystein contents. It is stated by Rutherford and Hawk (1907) that keratine of hair contains 4.95% of sulphur. In the Caucasian race, men's hair is more rich in its content than women's, and generally red hair is richest among the various colours. Takeda (1926) investigated Japanese hair and reported that the cystin content of hair varies in individuals and reaches its maximum in maturity. In the growing stage of 10-20 years, the growth of hair is superior but the cystin content is not great. Takeda gave the following figures on cystin contents of animal and human hair.

TABLE I.

Men's hair	13.69-14.51%	Women's hair	13.19-14.39%	Sheep wool	8.41-8.89%
Whale	8.15-7.86	Pig	11.50-12.51	Dog (Japanese)	13.24
Elephant (India)	7.60	Rat (Mus rattas)	12.05	Marmot	12.15
Ox (Japanese)	12.13	Ox (Holstein)	14.04	Rabbit (brown)	12.00
Rabbit (black)	11.31 etc.				

Okuda (1925) estimated the cystin and cystein contents of hair and feathers and reported that among sulphur containing

amino acids, cystin represents 95% of it while cystein is only 5%. Further, Girond and Bulliand (1928) from the histological standpoint, investigated the keratine formation of hair and stated that it is governed by the accumulation of glutathion.

Thus the investigation of cystin and cystein content of hair has great meaning in their physiology but the above researches are not sufficient to explain these important facts. The authors carried out the following experiments, using Okuda's new method for the determination of the cystin and cystein contents in hydrolytic products of protein.

#### I. MATERIALS AND METHOD OF PREPARATION.

Hair was collected as material in the following way: men's hair was collected from the monthly cuttings and the women's, from combings of different ages.

Preparation of the sample hair was carried out in the following way: the collected hair was washed in water, freed from dust and washed many times with alcohol; then the dried materials were extracted with ether for 4 days in Soxhlet's apparatus and the fat-freed residue was dried and reserved for the analysis.

#### II. THE METHOD OF DETERMINATION OF CYSTIN AND CYSTEIN.

For the determination of cystin and cystein in hair, Okuda's new method (1925) was used with the following modification. For the cystin determination, one g. of sample was hydrolysed with 20% HCl connecting the reflux condensor for 15 hours on a sand bath. It was diluted with water, decolorized with animal charcoal and placed in a measuring flask of 100 cc. For the titration with iodate solution, we preferred the reduction by Zn-dust, continued until the maximum gain of cystin. In the cystein determination, for protection against oxidation during the hydrolysis, the authors found that there is no need of a  $\text{CO}_2$  current, because, if we take 0.5 gm. sample in a narrow test tube with 10 cc. 20% HCl and put it in a flask containing 20% HCl with cooler and hydrolysed

for 8 hours continuously then the upper part of the test tube filled with HCl gas and no oxidation occurred. Then the cooled samples were filtered into a measuring flask of 50 cc and titrated with M/1000  $\text{KIO}_3$  solution as Okuda stated in descriptions of his method.

### III. RESULTS OF EXPERIMENT.

The samples which were prepared as above mentioned were analysed for cystin and cystein contents and the results tabulated in dry matter percentage.

TABLE II.

(a) Cystin content in the different parts of hair.

Person	Ages	Roots	Total	Tips
Women	26	14.9%	14.3%	12.78%
"	29	14.6-15.1 "	13.6 "	12.5-13.2 "

Parts of hair	From terminal pt. 0-5 cm.	5-10 cm.	10-13 cm.
Women 52	9.25%	12.6%	13.6%

In the above table, it is clear that the cystin content is different with the parts of hair and that toward the tips it is always less than that toward the roots.

TABLE III.

(b) Cystin contents of hair of the different seasons, ages and individuals.

Ages	6	17	18	20	25	29	31
Women	14.3%	14.1%	12.5%	14.7%	14.3%	13.6%	12.3%

Ages	41	47	49	51	55	58
Women	13.12%	14.15%	13.69%	14.28%	14.20%	13.22%

Ages	10 Years				19 Years			
Date of cutting hair	5/Mar.	20/Apr.	25/May	9/July	2/Feb.	11/Mar.	25/May	10/July
Men	15.4	14.65	14.80	14.44	14.4	13.12	13.9	14.2

Ages	20 Years						
Date of cutting hair	3/Feb.	11/March	19/Apr.	25/May	10/July	18/Aug.	25/Sep.
Men	13.7	13.2	13.7	14.6	14.1	14.2	14.6

Ages	53 Years					
Date of cutting hair	8/April	12/May	10/June	21/July	12/August	1/Sept.
Men	14.6	13.5	14.3	14.2	13.8	14.9

23/Sept.	17/Oct.	15/Dec.
14.2	15.1	15.7

Ages	75 Years					
Date of cutting hair	2/Feb.	29/April	20/June	13/August	16/Oct.	8/Dec.
Men	15.3	15.2	14.5	14.9	15.4	15.7

From the above table, it is observed that the cystin content of young men's hair, growing powerfully, is less than that of old men and also that the cystin content of hair of the same person differs at different seasons.

TABLE IV.

(c) The ratio of cystin to total nitrogen content of hair.

Ages	11 Years	19 Years	55 Years			
Cystin	14.65	14.20	14.25	13.80	14.90	15.20
Total/N	13.63	13.80	13.87	13.00	14.05	14.48
Cystin/N	1.075	1.029	1.027	1.067	1.061	1.048

Ages	76 Years			
Cystin	15.20	14.48	14.90	15.20
Total/N	14.00	13.93	13.36	13.74
Cystin/N	1.085	1.040	1.115	1.125

The ratio of cystin to total nitrogen is almost constant in the different ages while cystin content of hair varies with the ages, so it seems that there are other non-nitrogenous substances in hair.

In the whole hair of women, the nitrogen content is the same in the tips or in the root parts, but the cystin content is not the same. Then there seems to be somewhat of a difference in the

TABLE V.

Ages	26 Years			52 Years	
Women's Parts hair	Total	Distance from tip 0-7 cm.	Roots pt.	Distance from tip 0-5 cm.	10-13 cm.
Cystin %	14.31	12.78	15.10	9.25	13.6
Total N %	14.00	14.11	14.09	13.14	13.05
Cystin/N	1.022	0.906	1.073	0.700	1.042

TABLE VI.

(d) Melanin and cystin contents of black and white hair.

	Ratio	Melanin %	Total N %	Cystin %	Cystin/N
Black	2.95	2.54	13.25	14.20	1.071
White	1.00	0.86	14.15	13.20	0.932

chemical composition of keratine in both parts or a contamination with another nitrogenous substance.

The white hair of Japanese comes ordinarily in old age, changing the original black color. The above described samples were collected from the same old women.

The melanin content of black hair is far greater than that of white and the cystin content of the former is rich while the nitrogen content is poor.

TABLE VII.

(e) Ratio of the cystein and cystin of men's hair.

Ages	55 years			75 years	
Date of cutting hair	21/Sept.	17/Oct.	15/Dec.	16/Oct.	8/Dec.
Cystein %	1.81	1.40	0.84	1.37	0.72
Cystin %	14.25	15.10	15.72	15.42	15.70
Cystein/Cystin	0.127	0.093	0.055	0.089	0.046

Ages	10 years	11 years		20 years
Date of cutting hair	10/April	24/April	29/June	25/Sept.
Cystein %	1.60	1.89	1.89	1.90
Cystin %	14.20	14.65	14.80	14.60
Cystein/Cystin	0.113	0.129	0.128	0.130

From the above table, it is observed that compared with cystin content the relative quantity of cystein in hair is richer in the case of young men than in that of old men. On the contrary, in the case of old men the relative quantity of cystin is greater than that of young men. That the quantity of cystein is great in young men's hair seems to have some connection with Hopkin's glutathion.

### RESUMÉ.

(1) The cystin content varies with the different parts of hair and that of the terminal part is always less than that of the other part.

(2) The cystin content of young men's hair, that showed powerful growth, is less than that of old men.

(3) The ratio of cystin to the total nitrogen content of hair is almost constant in different ages while the cystin content varies with the ages of people.

(4) The melanin content of black hair is far greater than that of white, and the cystin content of the former is rich, while the nitrogen content is poor.

(5) The relative quantity of cystein in relation to cystin is higher in the case of young men than in that of old men and it seems that some connection with Hopkin's glutathion may be found in young men's hair but that in old men it may be scant.

### REFERENCES.

- Danforth (1925): Hair, with special reference to hypertrichosis.  
Girond and Bulliand (1928): *Compt. rend Soc. Biol.*, 98, 500.  
Hammerstein (1926): *Lehrb. d. Physiol. Chem.*  
Hopkins (1921): *Biochem. J.* 15, 286. (1925): 19, 787.  
Okuda (1925): *Jour. Dept. Agr. Kyushu Imp. Univ.*, 1, 4.  
Rutherford & Hawk (1907): *Jour. Biol. Chem.*, 3, 459.  
Takeda (1926): *Kyushu Imp. Univ. Bull. Sci. Terkult.*, 2, 262.



## WEITERE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS DER SPLANCHNIKOTOMIE AUF DIE ZUCKERAUSSCHIEDUNGSSCHWELLE.

VON

YOSHIO IWANAGA.

*(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. Ryokichi Inada an der  
Kaiserlichen Universität zu Tokio.)*

(Eingegangen am 15. Juni 1930.)

Die zahlreichen Untersuchungen, welche in hiesiger Klinik ausgeführt wurden, deuten übereinstimmend darauf hin, dass die Erregung des Sympathicus eine Steigerung der Zuckerausscheidungsschwelle nach sich zieht. Nur das Untersuchungsergebnis von Kawashima (1928) scheint damit nicht im Einklang zu stehen. Er fand, dass die doppelseitige Splanchnikotomie beim Hunde eine Steigerung der Schwelle und eine Herabsetzung der Assimilationskraft für Kohlehydrate verursacht. Weil die Erscheinung schwer zu erklären war, habe ich mit Kawashima zusammen (1929) noch einmal die Frage aufgenommen. Dabei ergab sich, dass der Anstieg des Schwellenwertes nach der Operation in einer bestimmten Zeit, gewöhnlich in der zweiten Woche, vorübergehend vorkommt. Hieraus ergab sich die Frage, ob dieser Anstieg ein Ausfallssymptom der sympathischen Zentralwirkung oder aber eine Folgeerscheinung der Sympathicusreizung darstellt. Diese Frage sollte durch einen Versuch entschieden werden, bei dem die Sympathicusendigung durch Ergotamin gelähmt wird. Im ersten Fall sollte der Schwellenanstieg nach der Operation durch das Gift unbeeinflusst bleiben, im zweiten aber dadurch beseitigt werden. Ausserdem wollte ich noch weiter sehen, wie die schwellesteigernde Wirkung der parasympathischen Reizgifte durch die Splanchnikotomie beeinflusst wird. Schon Kawashima (1928) in seiner Arbeit beobachtete zwar, dass beim splanchnikotomierten Hunde

das Acetylcholin den Schwellenwert gar nicht erhöht, jedoch wurde seine Untersuchung gerade in dem Stadium einer gesteigerten Schwelle ausgeführt. Weil diese Versuchsbedingung mir nicht geeignet schien, wollte ich den Versuch nach der Operation bei einem normalen Schwellenwert wiederholen.

Bevor ich aber auf Veranlassung und unter der Leitung von Prof. R. Inada und Prof. K. Sakaguchi zu den eigentlichen Versuchen überging, habe ich am Hunde den Verlauf wie die Verästelung der Splanchnici mit besonderer Vorsicht gut studiert und die Operation geübt, um die Splanchnici ohne Zurücklassung irgendeiner Faser vollständig durchschneiden zu können. Dabei fand ich, dass unsere Operation bei der früheren Arbeit nicht ganz einwandfrei war.

Bei meinen Untersuchungen ging ich so vor, dass ich zuerst dem Versuchshunde eine entsprechende Menge Traubenzucker als etwa 25 proz. wässrige Lösung mit einem Gummischlauch in den Magen einführte und dann Blut- wie Harnzucker serienartig halb- resp. einstündlich untersuchte, um den Schwellenwert für die alimentäre Glykosurie zu bestimmen. Darauf wurde beiderseitige Splanchnikotomie ausgeführt. Nachdem das Versuchstier sich von dem Operationseingriff gut erholt hatte, habe ich wieder durch Zuckerzufuhr den Schwellenwert bestimmt und so den Einfluss der Splanchnikotomie auf ihn beobachtet. Im Falle die Zuckerausscheidungsschwelle dabei erhöht war, wurde die Untersuchung wiederholt, indem Ergotamin vor der Zuckerdarreichung subkutan injiziert wurde. Später wurde Acetylcholin mit oder ohne gleichzeitige stomachale Zuckerzufuhr subkutan eingespritzt und dessen Einfluss auf den Blutzuckergehalt wie auf die Glykosurie untersucht. Die einzelnen Daten meiner Untersuchung sind in den Tabellen (I-VII) wiedergegeben. Hier sei bemerkt, dass bei meinen Versuchen an sieben Hunden die Splanchnikotomie an den letzten fünf Versuchstieren (Tabelle III-VII) sicher vollständig ausgeführt wurde, während bei den ersten zwei Hunden meine Operationstechnik noch nicht einwandfrei war.

TABELLE I

Hund Nr. 1. Körpergewicht 8,2 kg.

Datum 1929	Tage nach der Operation	Zucker g	Acetylcholin g	0.5% Ergotamin ccm	Blutzuckergehalt mg % (Glykosurie %)						Z. A. S. %
					vor	$\frac{1}{2}$ st	1	$\frac{1}{2}$ st	2	3	
2. III		30			106 (-)	122	115 (0.40)	114	109 (sp)	102 (-)	} unter 0.12 (ca0.11)
4. "		25			107 (-)	128	126 (0.54)	112	105 (-)	105 (0.25)	
8. "					Beiderseitige Splanchnikotomie						
13. "	5	20			96 (-)	133	114 (0.37)	105	100 (0.42)	100 (0.54)	unter 0.13 (ac.0.11)
18. "	10		0.25		96 (-)	130	141 (-)	108	108 (0.30)	44 (0.30)	0.14
20. "	12	20			94 (-)	139	114 (sp)	114	104 (0.30)	100 (-)	0.14
21. "	13	"		0.5	92 (-)	103	98 (sp)	99	95 (-)	98 (-)	0.10
26. "	18	"			106 (-)	141	129 (0.40)	120	102 (0.37)	95 (0.41)	ac. 0.13
27. "	19	"		0.5	98 (-)	110	105 (-)	98	100 (0.25)	101 (-)	0.11

TABELLE II.  
Hund Nr. 2. Körpergewicht 10.5 kg.

Datum 1929	Tage nach der Operation	Zucker g	Acetylcholin g	0.5 % Ergotamin ccm	Blutzuckergehalt mg % (Glykosurie %)						Z. A. S. %
					vor	½ st	1	1 ½	2	3	
5. III		20			96 (-)	105	98 (0.20)	100	101 (0.33)	95 (-)	0.10
7. "			0.2		104 (-)	186	142 (0.25)	116	119 (-)	110 (sp)	0.18
9. "											
Beiderseitige Splanchnikotomie											
13. "	4	20			96 (-)	150	153 (0.40)	110	103 (0.39)	110 (-)	etwas unter 0.15
15. "	6	"		0.5	96 (-)	101	100 (0.35)	100	99 (sp.)	92 (sp.)	0.10
17. "	8		0.2		90 (-)	125	129 (0.37)	106	100 (-)	97 (-)	0.12
20. "	11	20			107 (-)	129	113 (sp.)	90	100 (0.30)	102 (-)	0.12
26. "	17	"			101 (-)	126	120 (sp.)	104	105 (-)	108 (-)	0.12
27. "	18	"		0.5	97 (-)	114	110 (0.30)	100	98 (0.35)	98 (-)	0.11
30. "	21	"			101 (-)	125	105 (-)	99	92 (sp.)	98 (-)	0.12

TABELLE III.  
Hund Nr. 3. Körpergewicht 7 kg.

Datum 1929	Tage nach der Operation	Zucker g	Acetylcholin g	Blutzuckergehalt mg % (Glykosurie %)					Z. A. S. %
				vor	½ st	1	1½	2	1
28. V		17		100 (-)	122	110 (3.30)	98	95 (0.38)	99 (-)
1. VI		"		98 (-)	125	125 (-)	115	95 (0.40)	99 (-)
2. "									
Beiderseitige Splanchnikotomie									
5. "	3		0.15	95 (-)	114	57 (sp.)	85	90 (-)	95 (-)
6. "	4	17		107 (-)	120	114 (-)	114	110 (0.57)	110 (-)
8. "	6	"	0.15	100 (-)	130	130 (0.60)	105	98 (0.30)	98 (-)
13. "	11	"		97 (-)	140	125 (-)	100	98 (0.57)	102 (-)
15. "	13	"		90 (-)	114	120 (-)	105	105 (0.30)	102 (-)
19. "	17	"		94 (-)	110	98 (0.30)	105	100 (0.50)	108 (-)
26. "	24	"		107 (-)	119	120 (-)	108	98 (0.50)	98 (0.28)

unter  
0.12  
(0.10%)

TABELLE IV.  
Hund Nr. 4. Körpergewicht 12.5 kg.

Datum 1929	Tage nach der Operation	Zucker g	Acetylcholin g	Blutzuckergehalt mg % (glykosurie %)						Z. A. S. %
				vor	1 st.	1	1 ½	2	3	
2. VI		20		99 (-)	109	116 (0.03)	110	95 (sp.)	95 (-)	um 0.11
6. "		"		95 (-)	105	113 (-)	100	100 (-)	102 (-)	
7. "										
Beiderseitige Splanchnikotomie										
10. "	2		0.3	94 (-)	118	108 (-)	87	98 (-)	98 (-)	über 0.12
13. "	6	20		106 (-)	120	110 (0.30)	100	103 (-)	103 (-)	0.11
15. "	8	22	0.3	107 (-)	129	129 (-)	127	100 (0.40)	90 (-)	0.12
19. "	13	"		94 (-)	140	112 (sp.)	100	102 (0.45)	100 (-)	ca. 0.13
23. "	17	25		85 (-)	120	129 (sp.)	90	102 (-)	95 (0.35)	0.12
26. "	20	"		91 (-)	109	118 (-)	109	100 (sp.)	97 (-)	

TABELLE V.

Hund Nr. 5. Körpergewicht 11 kg.

Datum 1929	Tage nach der Operation	Zucker g	Acetylcholin g	Blutzuckergehalt mg % (Glykosurie %)						Z. A. S. %
				vor	$\frac{1}{2}$ st	1	$1\frac{1}{2}$	2	3	
17. VI		23		98 (-)	115	115 (-)	100	99 (-)	99 (-)	0.12
18. "		26		102 (-)	119	123 (-)	110	115 (0.40)	100 (-)	
20. "			0.2	94 (-)	147	159 (-)	122	95 (-)	98 (-)	
22. "										über 0.16
Beiderseitige Splanchnikotomie										
24. "	2		0.2	103 (0.40)	120	109 (0.55)	100	92 (0.40)	90 (0.60)	unter 0.10
26. "	4	20	"	91 (-)	118	94 (0.58)	100	97 (0.50)	97 (0.40)	ca 0.10
30. "	8	25		96 (-)	121	120 (0.35)	108	93 (0.40)	96 (0.40)	0.10-0.11
3. VII	11	"		84 (-)	110	104 (-)	101	92 (0.30)	95 (0.40)	
8. "	16	"		96 (-)	128	120 (-)	108	92 (0.40)	98 (-)	



TABELLE VII.

Hund Nr. 7. Körpergewicht 12 kg.

Datum 1929	Tage nach der Operation	Zucker g	Acetylcholin g	Blutzuckergehalt mg % (Glykosurie %)						Z. A. S. %
				vor	1 <sup>2</sup> st	1	1 1/2	2	3	
26. VI		25		99 (-)	112	112 (-)	108	100 (-)	100 (-)	0.12
29. "		28		97 (-)	115	122 (-)	100	105 (0.42)	98 (sp.)	
6. X			0.25	87 (-)	148	182 (sp.)	150	121 (sp.)	90 (-)	
18. "										0.18
Beiderseitige Splanchnikotomie										
23. "	5		0.25	90 (-)	125	76 (-)	97	87 (-)	92 (-)	über 0.12
24. "	6	25		101 (-)	107	105 (-)	110	107 (-)	105 (-)	über 0.11
25. "	7		0.25	99 (-)	129	81 (sp.)	79	85 (-)	89 (-)	0.13
26. "	8	35		97 (-)	105	124 (-)	110	96 (sp.)	96 (-)	0.12
30. "	12	30		88 (-)	128	112 (0.42)	112	105 (sp.)	99 (-)	

Beim Versuchshunde Nr. 1 und Nr. 2 zeigte die Zuckerausscheidungsschwelle nach der Operation eine ganz leichte Steigerung, welche durch Ergotamin vollständig unterdrückt wurde. Dagegen wurde bei den übrigen fünf sicher total splanchnikotomierten Hunden eine solche Schwellenwerterhöhung ganz vermisst. Es gibt sogar einen Fall (Hund Nr. 5 Tabelle V.), bei welchem die Schwelle nach der Operation eher zu einer leichten Erniedrigung geneigt war. Nach diesen Untersuchungsergebnissen muss der Schwellenwertanstieg nach der Splanchnikotomie als Folge einer mangelhaften Operation aufgefasst werden, und diese Steigerung beruht wohl auf Sympathicusreizung, weil sie durch Ergotamingebrauch beseitigt wurde. Unsere Untersuchungen zeigen unzweideutig, dass die vollständig ausgeführte doppelseitige Splanchnikotomie keine Schwellenwerterhöhung verursacht, ja sogar oft eher die Neigung zur leichten Erniedrigung veranlasst. Ausserdem kann man auch aus den Tabellen leicht ersehen, dass Acetylcholin, welches vor der Operation eine starke Hyperglykämie und eine deutliche Steigerung der Zuckerausscheidungsschwelle hervorrief, nach vollständiger Splanchnikotomie den Schwellenwert gar nicht beeinflusste und dass dessen Einfluss auf den Blutzuckergehalt auch sehr undeutlich war. Dieser Befund beweist, dass die Acetylcholinhyperglykämie wesentlich von sympathischer Natur ist, und dass die durch dieses Gift erzeugte Steigerung der Zuckerausscheidungsschwelle auch als Folge der zentralen Sympathicusreizung zu deuten ist.

#### KURZE ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach der vollständigen doppelseitigen Splanchnikotomie bleibt die Zuckerausscheidungsschwelle fast die gleiche wie vor der Operation.
2. Bei unvollständiger Splanchnikotomie kann eine Steigerung der Zuckerausscheidungsschwelle als Folge der Sympathicus-erregung zum Vorschein kommen, welche aber durch Ergotamin vollständig unterdrückt wird.

3. Acetylcholin steigert den Blutzuckerwert wie die Zuckerausscheidungsschwelle beim gesunden Tiere sehr deutlich, aber nach vollständiger Splanchnikotomie wird die letztere durch das Gift gar nicht beeinflusst, und der Blutzuckeranstieg auch sehr undeutlich. Hieraus muss man schliessen, dass die Steigerung der Zuckerausscheidungsschwelle durch Acetylcholin eine Folgeerscheinung der zentralen Sympathicusreizung darstellt und die Acetylcholinhyperglykämie auch wesentlich von sympathischer Natur ist.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, hier Herrn Prof. K. Gyotoku meinen herzlichsten Dank für seine freundliche Hilfe bei meinen Operationen auszusprechen.

#### LITERATUR:

Kawashima, S. (1928): Journ. of Biochem. 9, No. 2, S. 337

Über den Einfluss der Splanchnikotomie auf die  
Zuckerausscheidungsschwelle.

Kawashima, S. und Iwanaga, Y. (1929): Journ. of Biochem. 11,  
No. 2, S. 293.

Über den Einfluss der Vago-splanchnikotomie auf die  
Zuckerausscheidungsschwelle.



## POTENTIOMETRIC DETERMINATION OF CYSTINE AND CYSTEINE.

By

KAGEYU YAMAZAKI.

(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,  
Fukuoka. Director: Prof. Keizo Kodama.)

(Received for publication, June 14, 1930.)

Since an important part played by sulphhydryl compound in the tissue respiration has been confirmed by the brilliant work of Hopkins on glutathione, its content in various tissues has been intensely studied by many investigators. It is regrettable, however, that the method used for its quantitative determination seems to be not fully satisfactory. Tunnicliffe's method (1925) can be applied only when a large amount of material is available, for the endreaction, using sodium nitroprussid as external indicator, is less sensitive, when the concentration of  $-SH$  compound is small, and often escapes our attention, owing to the transitory nature of the colour developed.

Okuda (1925) published a valuable method which consists in extracting the sulphhydryl compound with sulfosalicylic acid and titrating with iodate solution in the presence of iodide, the endreaction being read by the appearance of yellow colour of free iodine. Of course this method can not be applied to the coloured solution, such as the hydrolysate of protein.

In a later publication, Okuda (1929) recommended to add at first a definite amount of iodine solution to the hydrolysate and to titrate back the excess of iodine with thiosulfate, the endreaction being taken by the disappearance of the colour of iodine absorbed in chloroform, added to the reaction system.

It was found previously however, in testing this method, that the titration of iodine absorbed in chloroform cannot be executed

in a convincing manner. Hence we endeavoured to remove this disadvantage and found that a potentiometric method is more convenient and accurate for the estimation of the minute amount of cystine and cysteine, even in the coloured solution.

#### PROCEDURE.

The titrations-vessel of about 50 cc. capacity was fitted with the rubber stopper, which carries 4 bores for the electrode, the agar salt bridge, the titrating microburette and a tube for bubbling. As the electrode the blank Pt wire of 0.5 mm. diameter and of 8 cm. length was used. The gold was also tried, but found to be rather unfit, owing to its slowness to follow the potential change. As the half cell the saturated calomel electrode was used, and it was connected with the reactions-vessel by means of the agar salt bridge. The air was bubbled through the solution at a constant rate for the purpose of stirring. The potential reading was taken one minute after each addition of an aliquot amount of the oxidising solution from the microburette. The endreaction was read by a point where maximal potential spring occurred. In this case it is not necessary to wait until the potential attains to the equilibrium as the estimation of the real potential value is not to our purpose.

#### EXPERIMENTS.

##### *I. The titration of cystine with bromate in the presence of bromide.*

Cystine is oxidized with bromine as the following equation shows.



When the dilute bromine solution is used, the endreaction of the titration is not clear. In the potentiometric titration, as soon as the titration arrives at the endreaction, the potential of the solution gives rise to a marked jump, as is indicated in Table I. It is possible, therefore, to carry out microestimation with fair accuracy.

In the following tables the potential was represented in millivolt in reference to the saturated caromel electrode.

TABLE I. The titration of cystine by  $\text{KBrO}_3$  in the presence of  $\text{KBr}$ .

Titrated solution	2% HCl 11.0 cc. $\frac{M}{10}$ KBr. 1.0 $\frac{0.45 M}{1000}$ cystine solution in 2% HCl 1.0			2% HCl 11.0 cc. $\frac{M}{10}$ KBr 1.0 $\frac{0.45 M}{1000}$ cystine solution in 2% HCl 2.0		
	$\frac{M}{1000}$ KBrO <sub>3</sub> required (a)	Potential (b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$	$\frac{M}{1000}$ KBrO <sub>3</sub> (a)	Potential (b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$
	0	496		0	475	
	0.1	496		0.2	488	
	0.3	504		0.6	500	
	0.5	517		1.0	505	
	0.71	544		1.4	518	
	0.73	549	250	1.45	527	180
	0.75	632	4150	1.48	540	433
	0.77	722	4500	1.50	654	5700
	0.79	729	350	1.52	717	3150
				1.56	722	125

The temperature and the acidity of cystine solution to be examined have some influence upon the sharpness of potential break. The stronger the acidity and the higher the temperature, the more distinct is the potential break at the endpoint of the titration.

The quantity of bromide solution exerts also a great effect upon the sharpness of the potential break.

*II. The titration of cystine with bromate in the absence of bromide.*

Bromate in the absence of bromide has an oxidizing power, which may be represented by the following equation.

TABLE II. The effect of temperature.

Titrated solution	2% HCl	10.0 cc.				"
	4% HCl	1.0				"
	$\frac{M}{10}$ KBr	1.0				"
	$\frac{0.45 M}{1000}$ cystine	1.0				"
Temp.	14.8°C.			30.5°C.		
	$\frac{M}{1000}$ KBrO <sub>3</sub> (a)	Potential (b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$	$\frac{M}{1000}$ KBrO <sub>3</sub> (a)	Potential (h)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$
	0	520		0	496	
	0.1	528		0.1	496	
	0.2	538		0.2	498	
	0.31	548		0.3	504	
	0.4	558		0.4	510	
	0.5	526		0.6	530	
	0.6	591	330	0.69	540	200
	0.7	624	1233	0.71	544	250
	0.73	661	2050	0.73	549	450
	0.75	702	1500	0.75	632	4500
	0.77	732	450	0.77	722	300
	0.79	741		0.81	734	

TABLE III. The effect of acidity.

Titrated solution	4% HCl	11.0	1% HCl		11.0	
	$\frac{M}{10}$ KBr	1.0	$\frac{M}{12}$ KBr		1.0	
	$\frac{0.45 M}{1000}$ cystine	1.0	$\frac{0.45 M}{1000}$ cystine		1.0	
Temp.	20°C			"		
	$\frac{M}{1000}$ KBrO <sub>3</sub> (a)	Potential (b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$	(a)	(b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$
	0	510		0	524	
	0.1	510		0.1	534	
	0.2	511		0.2	552	
	0.3	513		0.3	569	
	0.4	515		0.4	585	
	0.5	517		0.5	599	
	0.6	523		0.6	620	
	0.7	537		0.7	644	
	0.72	542	250	0.72	647	
	0.74	581	1950	0.74	649	100
	0.76	692	5550	0.76	672	1150
	0.78	709	850	0.78	710	1900
				7.80	736	1300



Therefore, cystine is oxidated by the bromate in absence of bromide as the following equation shows.

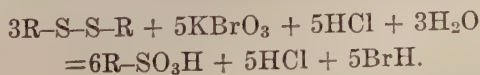


TABLE IV. The effect of the concentration of KBr.

Titrated solution	$\frac{M}{10} \text{ KBr}$			$\frac{M}{10} \text{ KBr}$		
	4% HCl	2% HCl	0.45 M cystine	4% HCl	2% HCl	0.45 M cystine
	5.0	1.0	1.0	1.0	9.0	1.0
	1000			1000		
	$\frac{M}{1000} \text{ KBrO}_3(a)$	Potential (b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$	(a)	(b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$
	0	480		0	496	
	0.2	540		0.2	498	
	0.4	564		0.4	510	
	0.6	578		0.6	530	
	0.7	600	400	0.71	544	250
	0.75	620	1100	0.73	549	4150
	0.77	642	1300	0.75	632	4500
	0.79	668	700	0.77	722	350
	0.81	682		0.79	729	

As will be seen from Table V the electrometrical titration of cystine with bromate solution gives satisfactory value if the temperature and acidity of the titrated solution are properly adjusted.

Since 5 molecules of bromate correspond to 3 molecules of cystine, it can easily be calculated from the result above mentioned,

TABLE V. The titration of cystine with potassium bromate solution. The titration vessel contained 10 cc. of 2% HCl, 1 cc. of 4% HCl, 1 cc. of 2% HCl, containing ca. 0.1 mg. cystine.

$\frac{M}{1000} \text{ KBrO}_3(a)$	Potential (b)	$\frac{b}{a}$
0	514 M. V.	
0.10	518	
0.30	530	
0.50	546	
0.70	564	
0.72	567	
0.74	575	400
0.76	676	5050
0.78	714	1900
0.80	724	500
0.82	729	

that the solution contains 0.108 mg of cystine, which stands in close agreement with the theoretical value.

The effect of temperature and acidity is fairly pronounced as will be clearly demonstrated in tables VI and VII.

TABLE VI. The effect of temperature upon the titrationvalue of cystine with potassium bromate.

The titrations-vessel contained 12 cc. of 2% HCl and 1 cc. of 0.46M/1000 cystine solution.

Temperature	4°C	8.5°C	13.70C	18°C	22.5°C	26.5°C	305 °C
Required $\frac{M}{1000}$ KBrO	0.97	0.89	0.83	0.81	0.79	0.77	0.77

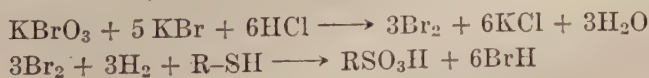
TABLE VII. The effect of the acidity upon the titrationvalue of cystine with potassium bromate.

The titrationsvessel contained 11 cc. of HCl of various concentration and 1 cc. of 0.46M/1000 cystine solution.

Concentration of HCl	1%	2%	4%
Required $\frac{M}{1000}$ KBrO <sub>3</sub>	2.6	0.79	0.77

### III. The titration of cysteine with bromate in the presence of bromide.

Cysteine is oxidised to cysteinic acid by the bromine, which is produced by the action of bromate upon bromide in the presence of a sufficient amount of acid. The reaction may be represented as follows.



Hence, one molecule of potassium bromate corresponds to one molecule of cysteine. In carrying out the titration it was found that this was really the case as shown in Table VIII, and the potential jump at the endreaction was also sharp enough.

TABLE VIII. The titration of cysteine with bromate in the presence of bromide.

The titrations-vessel contains:—

$\frac{0.84 \text{ M}}{1000}$	cysteine	1.0 cc.
2%	HCl	10.0 „
4%	HCl	1.0 „
$\frac{\text{M}}{10}$	KBr	1.0 „

$\frac{\text{M}}{1000}$	KBrO (a)	Potential (b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$
0		317	
0.2		322	
0.4		338	
0.6		369	
0.8		415	460
0.82		454	1950
0.84		648	9700
0.86		785	6850
0.88		800	750

The effect of the acidity in this case was not so marked as in the foregoing experiment, being only perceptible when the temperature of the titrated solution was lowered. As will be seen from Table IX, at the temperature of 18°C no difference in the endreaction was observed between 1% and 4% hydrochloric acid. But when the temperature was lowered to 4.5°C, more than the theoretical amount was required.

TABLE IX. The effect of temperature and acidity upon the titration value of cysteine with bromate in the presence of bromide.

Titrated solution:	2% HCl			4% HCl			2% HCl		
	Aq dest			Aq dest			Aq dest		
	$\frac{M}{10}$ KBr			$\frac{M}{10}$ KBr			$\frac{M}{10}$ KBr		
	$\frac{0.84 M}{1000}$ cysteine			$\frac{0.84 M}{1000}$ cysteine			$\frac{0.84 M}{1000}$ cysteine		
Temp.	18°C			18°C			4.5°C		
	$\frac{M}{1000}$ KBrO <sub>3</sub> (a)	Poten- tial (a)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$	(a)	(b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$	(a)	(b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$
	0	335		0	330		0	320	
	0.2	340		0.2	334		0.2	322	
	0.4	344		0.4	340		0.6	327	
	0.6	382		0.6	360		1.0	338	
	0.79	436		0.81	404	400	1.2	423	
	0.81	483	2350	0.83	472	1400	1.25	458	500
	0.83	600	5850	0.85	762	15400	1.30	524	3300
	0.85	805	10250	0.87	780	900	1.33	794	13500
	0.87	826	1050				1.36	820	1300

#### IV. Potentiometric titration of cysteine with potassium bromate.

Cysteine can be titrated with bromate in absence of bromide. The reaction here involved may be written as follows.



Hence, one molecule of KBrO<sub>3</sub> corresponds to one molecule of cysteine. But this is satisfied when the temperature and the acidity are well controlled. As will be seen from Table IX and X respectively the lower temperature and the lower acidity lead to a higher value than the theoretical.

TABLE X. Influence of temperature.

Titrated solution contains:	$\frac{0.85 \text{ M}}{1000}$ cysteine 1.0	„
	2% HCl 10.0	„
Temperature	19.8°C	9.5°C
required $\frac{\text{M}}{1000}$ KBrO <sub>3</sub>	0.85	0.90

TABLE XI. Influence of acidity.

Titrated solution contains:	$\frac{0.85 \text{ M}}{1000}$ cysteine 1.0	$\frac{0.85 \text{ M}}{1000}$ cysteine 1.0
	4% HCl 12.0	1% HCl 12.0
Temperature	22°C	22°C
required $\frac{\text{M}}{1000}$ KBrO <sub>3</sub>	0.85	1.08

#### V. *Potentiometric titration of cysteine with iodate in the presence of iodide.*

The iodometric titration of cysteine or the compounds has been extensively used by many investigators of biological field. Prof. Okuda also has given very valuable method, which is now widely used in our country.

According to him the titration of cysteine with iodate in the presence of iodide is more complicated than with bromate owing to the fact that cysteine can be oxidised to the stage of cystine or cysteinic acid. The ratio of cystine and cysteinic acid formed varies with the temperature and the acidity at which the reaction is carried out. When cystine is formed, one molecule of cystine corresponds to one atom of iodine, while in the case of cysteinic acid, 6 atoms. The intermediate value of iodine, therefore, shows that cystine and cysteinic acid are produced at variable ratios.

The whole problem was studied once more, using the potentiometric titration. The experimental procedure is the same as in the previous experiment. The results of the experiment on the effect of the temperature and the acidity are summarised in Tables XII and XIII.

TABLE XII. The effect of the temperature.

The reactions-vessel contained 1.0 cc. 0.85M/1000 cysteine, 10 cc. of 2% HCl  
1 cc. of 4% HCl and 1 cc. of M/10 KJ.

Temp.	4°C			11.5°C			28°C		
	Requird M 1000 KJO <sub>3</sub>	Poten- tial (b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$	"(a)	"(b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$	'(a)	"(b)	$\frac{\Delta b}{\Delta a}$
	0	204		0	207		0	217	
	0.1	227		0.2	227		0.2	231	
	0.2	240		0.33	242		0.4	242	
	0.24	243		0.35	246		0.5	252	100
	0.28	247		0.37	250	35	0.52	294	2300
	0.294	251		0.39	257	7200	0.54	315	1050
	0.31	259	600	0.41	281	700	0.56	324	
	0.33	290	1550	0.43	295				
	0.35	300	500	*0.45	303				
	*0.37	309							

Remark: At the point marked \* faint yellow colour was produced.

TABLE XIII. Influence of the acidity.

The titrated solution contains:	0.85 M cysteine 1.0		0.85 M cysteine 1.0		0.85 M cysteine 1.0	
	1000		1000		1000	
	1% HCl	10.0	4% HCl	10.0	8% HCl	11.0
	2% HCl	1.0	8% HCl	1.0	$\frac{M}{10}$ KJ	1.0
	$\frac{M}{10}$ KJ	1.0	$\frac{M}{10}$ KJ	1.0		
Temperature	17.5°C		17.5°C		17.5°C	
Required $\frac{M}{1000}$ KJO	0.47		0.42		0.38	

As will be seen from Table XII the potential spring is not so apparent as in the case of bromate. Nevertheless the end-reaction is precise enough and is obtained just before the yellow colour due to free iodine appears.

The theoretical value of the titration of 1 cc. of 0.00085 mol of cysteine with 0.001 mol iodate solution should be 0.141 cc., when the oxidation stops at the stage of cystine, while when all of the molecules are oxidised to cysteinic acid, 0.85 cc. is required. All the experimental results gave the intermediate values. Moreover, the higher the temperature and the lower the acidity, the larger the titrations value. This means that here more cysteinic acid was produced.

In the course of the above experiment it was also noticed that when the oxidation of cysteine with iodine proceeds more slowly, the more cystine is formed and in the reverse case the more cysteinic acid. Therefore, the rate of titration exerts here also a great influence. The following experiments gives the evidence.

Into 3 cc. of the solution of the acidity equivalent to 2% HCl, which contained 1.0 cc. of 0.00084 mol cysteine and 0.1 mol KJ, 2.0 cc. of 0.001 mol  $\text{KJO}_3$  was added in one experiment as quickly as possible, and in another slowly drop by drop. The excess of iodine was titrated back with thiosulfate. In the first case 0.55 cc. of 0.005 N iodine solution was used, while in the second, 0.46 cc.

It should be concluded, therefore, that the titration of cysteine with iodine should be carried out under a strictly controlled condition in respect of temperature, acidity and the rate of addition of iodine, and the value should be calculated from the experimental value obtained on pure cysteine titrated exactly under the same condition. This is the serious drawback in the iodine method.

This potentiometrical method can be satisfactorily applied to the colored hydrolysate, as well as to the extract obtained from tissues with sulfosalicylic acid. The cleavage products of protein, acetone-bodies, creatine and creatinine do not interfere. To determine cysteine in the proteinhydrolysate, Okuda first decolorized

with charcoal and then titrated with iodate as mentioned above. According to him, cysteine was absorbed by charcoal to a great extent, but this could be removed by washing thoroughly. But it was found that this recovery was not so complete when a small amount of cysteine was present. It seems, therefore, more preferable to avoid the use of charcoal and to titrate directly, this being only possible by the application of the potentiometric method.

Okuda described that the reduction of cystine with zinc dust in coloured hydrolysate is incomplete. The author's experiments agreed with his observation.

#### VI. Potentiometric titration of cysteine with iodate.

The titration of cysteine with iodate in absence of iodide was studied potentiometrically. The experiments showed that the influence of temperature is here also fairly significant, but that of acidity is inconsiderable.

TABLE XIV. The effect of the temperature on the titration with iodate. Each titrations-vessel contained 1.0 cc. of 0.00084 mol cysteine, 10 cc. of 2% HCl.

Temperature	4°C	11°C	29°C
Required 0.001 mol KJO <sub>3</sub>	.56	.58	.69

TABLE XV. The effect of the acidity.

Each titrations-vessel contained 1.0 cc. of 0.00084 mol cysteine and 12 cc. of HCl of the concentration given in the table.

Temperature 25°C.

Concentration of HCl	1%	4%
Required 0.001 mol KJO <sub>3</sub>	0.62	0.63

No aminoacid save cysteine is oxidised by iodate in an acid solution, containing 2% hydrochloric acid. But if the cysteine solution contained tryptophan, it required more iodate solution

and at the same time ammonia was found to develop as is shown in Tables XVI and XVII. Since typtophan alone is not oxidised by iodate at all, certain catalytic process of cysteine might intervene in this oxidizing process.

TABLE XX. Influence of tryptophan upon the titration value of cysteine with  $\text{KJO}_3$  alone.

The titrated solution contains:	0.001 mol tryptophan in 2% HCl 1.0 cc. 2% HCl 11.0 cc.	0.00085 mol cysteine 1.0 2% HCl 11.0	0.001 mol tryptophan 1.0 0.00085 mol cysteine 1.0 2% HCl 10.0
Temperature	19.5°C	19.5°C	19.5°C
Required 0.001 mol $\text{KJO}_3$ in cc.	0	0.61	0.71

TABLE XXI. The ammonia production due to the oxidation of tryptophan with iodate in the presence of cysteine.

The reactions mixture contains:	0.01 mol tryptophan in 2% HCl 5.0 4% HCl 5.0 0.01 mol $\text{KJO}_3$ 2% HCl 5.0	0.01 mol cysteine in 2% HCl 5.0 4% HCl 5.0 0.01 mol $\text{KJO}_3$ 5.0 2% HCl 5.0	0.01 mol tryptophan in 2% HCl 5.0 0.01 mol cysteine 5.0 0.01 mol $\text{KJO}_3$ 5.0 4% HCl 5.0
Ammonia produced $\left(\frac{N}{100}\right)$	0	0	0.23

### DISCUSSION.

The titration of cystine or cysteine with bromate was first introduced by Prof. Okuda and also was discussed by him in connection with the effect of the temperature and the acidity of the titrated solution. In this method the endreaction is recognized by the appearance of brown color due to the free bromine. But this

appeals to our eye when the amount of free bromine attains to a certain amount in the titrated solution. Hence in a very diluted solution, as is usually the case in the biological micro-estimation of SH-compound contained in the biological fluid, the percentage of error in the titration value becomes relatively large. This can be avoided to a certain extent by the application of potentiometric titration. The potential jump always occurs prior to the first appearance of yellow colour and in a distinct manner so that no individual error is allowed to come in. There exists no alternative whether we titrate with bromate solution in the presence of bromide or in its absence, if proper precautions are paid for the temperature and the acidity of the reaction system.

One of the drawbacks in the titration with bromate is the fact that certain amino acids such as tyrosine and tryptophan are oxidised. Therefore, for the solution containing these amino acids with cysteine as protein hydrolysate the bromate cannot be used. In this case the iodometric titration is rather preferable. In the presence of iodine the iodate only oxidises cysteine, though in its absence tryptophan may be simultaneously oxidised to a certain extent. But owing to the lower oxidation potential exhibited by iodate, the oxidation of cysteine to cysteinic acid does not run completely. Some portion of the cysteine remains at the stage of cystine. Moreover, the proportion of cystine and cysteinic acid formed is affected seriously by the temperature, the acidity, the concentration of cysteine present and the rate at which the oxidising agent is added to. It is obvious, therefore, that the iodometric titration is also far from satisfactory. Unfortunately there is no other good method at present. We are obliged to use this method under utmost precautions.

#### SUMMARY.

It is recommended to apply the potentiometric titration for the determination of cystine and cysteine, the details of which are reported in this paper. Here the following summary is given.

1. Pure cystine and cysteine solution can be accurately titrated with bromate either in the presence of bromide or in its absence.

2. If the solution contains other aminoacids besides cystine, such as protein hydrolysate the titration with iodate in the presence of iodine is more accurate.

3. As is already depicted by Okuda, the temperature and the acidity of the solution have the marked effects upon the the titrating value, because cysteine can be oxidised to cystine or cysteinic acid in varying ratio as these factors change.

4. It was found, moreover, that the rate of titration with iodine has also some influence. When it is carried out more slowly the more cystine is formed and in the reverse case the more cysteinic acid.

5. Among various aminoacids only tryptophan exerts a definite influence upon the titrating value of cysteine by iodate. Perhaps the oxidation of tryptophan may be induced by the presence of cysteine.

The author is deeply indebted to Prof. Keizo Kodama for his kind advice throughout this investigation.

#### REFERENCES.

- Okuda, Y. (1925): *Journ. of Biochemistry*, 5, 201.  
Okuda, Y. (1929): *Nihon Nogeikagakukai Zasshi*, 5, 549.  
Tunnicliffe (1925): *Bioch. Journ.*, 19, 194.

## BIOCHEMICAL STUDIES ON THE AURICULO- VENTRICULAR JUNCTIONAL SYSTEM OF HEART.

### II. The Metabolic Activity

By

KAGEYU YAMAZAKI.

*(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,  
Fukuoka. Director: Prof. Keizo Kodama.)*

(Received for publication, June 24, 1930.)

#### INTRODUCTION

One of the characteristic features of biochemical interests of the auriculoventricular junctional system exists in the intense Nadi-reaction, which was first called attention to by Katsunuma (1924). As this reaction is believed by histologists to be evoked by the oxidase, its occurrence should be correlated with the oxidative activity of the tissue. Pick (1924), therefore, taking cognizance of the facts such as the intense oxidase reaction and the rich glycogen content of the system, suggested that a brisk metabolism might take place there. But in accepting this postulation we encountered certain difficulties in the contribution of Kolmer and Fleischmann (1928). They notified that the oxygen consumption of the conducting system of heart is far less when compared with that of the corresponding heart muscle. Bładze and Wertheimer (1928) also presented the evidence which stands in favour of this view.

These inconcordant views on the oxidative activity of the conducting system may be due to inappropriate assumption that the intense Nadi-reaction is associated with the high oxidase content. To get a definite understanding, therefore, whether the metabolic activity of the system in comparison with that of heart muscle is

brisk or not, the quantitative studies on the oxidase and dehydrogenase of the system were carried out. In addition to this the content of glutathione and the oxygen consuming activity were determined and compared with those of the heart muscle.

I. THE DEHYDROGENASE ACTIVITY OF THE AURICULOVENTRICULAR JUNCTIONAL SYSTEM AND ITS COMPARISON WITH THAT OF HEART MUSCLE OF OX.

The tissue under examination was isolated with utmost care from the surrounding connective tissue and then chopped up by means of scissors. 0.1 or 0.2 gm of this paste was introduced into the vacuum tube of Thunberg together with 0.5 or 1.0 cc. of the

TABLE I.  
The activity of methyleneblue reduction of Tawara's bundle and heart muscle.

OX I.	M/2500 methyleneblue cc.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Tawara's bundle gm.	0.1		0.1		0.2	
	Heart muscle gm.		0.1		0.1		0.2
	Time for decolorization	6'.10"	3'.50"	6'.15"	3'.25"	2'.55"	1'.30"
OX II.	M/2500 methyleneblue cc.	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5
	Tawara's bundle gm.	0.1		0.1		0.1	
	Heart muscle gm.		0.1		0.1		0.1
	Time for decolorization	7'.15"	2'.30"	18'.15"	7'.25"	8'.50"	2'.25"
OX III.	M/2500 methyleneblue cc.	0.5	0.5	1.0	1.0		
	Tawara's bundle gm.	0.1		0.1			
	Heart muscle gm.		0.1		0.1		
	Time for decolorization	9'.50"	2'.30"	31'.10"	6'.25"		
OX IV.	M/2500 methyleneblue cc.	0.5	0.5	0.5	0.5		
	Tawara's bundle gm.	0.1		0.1			
	Heart muscle gm.		0.1		0.1		
	Time for decolorization	5'.55"	2'.25"	5'.50"	2'.25"		
OX V.	M/2500 methyleneblue cc.	0.5	0.5	1.0	1.0		
	Tawara's bundle gm.	0.1		0.1			
	Heart muscle gm.		0.1		0.1		
	Time for decolorization	9'.50"	4'.15"	18'.50"	8'.40"		
OX VI.	M/2500 methyleneblue cc.	0.5	0.5	1.0	1.0		
	Tawara's bundle gm.	0.1		0.1			
	Heart muscle gm.		0.1		0.1		
	Time for decolorization	9'.40"	7'.50"	12'.05"	21'.30"		

M/2500 methylene blue solution and 0.3 cc. of phosphate buffer of pH 7.4. The evacuation was continued for 3 minutes at 5 mm. Hg pressure. The tube was then dipped into a thermostat kept at 35°C and the time for complete decolorization was recorded. The results are summarised in Table I.

It is apparent from the above table that the auriculoventricular junctional system is much inferior to heart muscle in the rate of methyleneblue reduction. But, as is usually assumed, this rate is governed by two factors, namely by the dehydrogenase activity and the quantity and the nature of hydrogen donators. Therefore, to confirm that this less activity of methyleneblue reduction of the system is not due to the relative lack of donators but to the low activity of its dehydrogenase, a similar experiment was repeated, adding sodium succinate as a representative of such donators. The results are indicated in Table II.

TABLE II.

The activity of methyleneblue reduction of Tawara's bundle and heart muscle in the presence of sodium succinate.

OX VII.	M/2500 methyleneblue cc.	0.5	0.5
	M/10 sodium succinate cc.	0.3	0.3
	Heart muscle gm.	0.1	
	Tawara's bundle gm.		0.1
	Time for decolorization	2'.30''	11'.55''
OX VIII.	M/2500 methyleneblue cc.	0.5	0.5
	M/10 sodium succinate cc.	0.3	0.3
	Heart muscle gm.	0.1	
	Tawara's bundle gm.		0.1
	Time for decolorization	2'.35''	13'.0''
OX IX.	M/2500 methyleneblue cc.	0.5	0.5
	M/10 sodium succinate cc.	0.3	0.3
	Heart muscle gm.	0.1	
	Tawara's bundle gm.		0.1
	Time for decolorization	4'.25''	16'.0''

It is obvious from these experimental results that the addition of sodium succinate as a powerful hydrogen donator did not bring about the shortening of the reductions-time, thus justifying the conclusion that the dehydrogenase activity of Tawara's bundle is inferior to that of the heart muscle.

## II. THE OXIDASE CONTENTS OF THE AURICULOVENTRICULAR JUNCTIONAL SYSTEM.

As already referred to, Katsunuma made the observation that the conducting system gave the intense so-called oxidase reaction. Since this staining method cannot be considered as adequate for the investigation of the kinetics of the enzym, the author used Steaemler and Sanders' (1925) method modified by Shin for the quantitative determination of oxidase content. The whole process runs as follows:

0.1 gm. of the tissue under investigation was carefully weighed out into a porcelain mortar and ground up with a small portion of the purified sand and 1 cc. of M/15 phosphate buffer of pH 7.6. The paste was transferred into the conic flask with ground stopper of 200 cc. capacity by the aid of 1 cc. of the phosphate buffer and 2 cc. of M/150  $\alpha$ -naphthol solution. Then 2 cc. of para-phenylendiamine solution was added, which was prepared by dissolving 0.7205 gm. of para-phenylendiamine in 1 liter of M/150 HCl. The hydrochloric acid was used to prevent the spontaneous oxidation of p-phenylendiamine. After the complete mixture of the contents by shaking the flask was brought into the thermostat kept at 35°C, and on the lapse of 15 minutes, 20 cc. of xylol was added to extract the indophenolblue produced. The xylol was separated by centrifugalising for 2 minutes and its color was matched against the standard aqueous fuchsin solution. For convenience the amount of indophenol was indicated by mg. of fuchsin.

As material Tawara's bundle of ox heart and the muscle of septum ventriculi were used 3-4 hours after the killing of the animal. The experimental results are tabulated in Table III.

TABLE III.

The oxidase contents of Tawara's bundle and heart muscle.

No. of ox	Sort of muscle	Indophenolblue indicated by mg. of fuchsin.
1	Tawara's bundle of right ventricle	0.00799
	Heart muscle	0.10546
2	Left Tawara's bundle	0.00827
	Heart muscle	0.11658
3	Right Tawara's bundle	0.00886
	Heart muscle	0.09580
4	Left Tawara's bundle	0.00609
	Heart muscle	0.07349
5	Tawara's bundle	0.01236
	Heart muscle	0.08325
6	Tawara's bundle	0.00758
	Heart muscle	0.05070

The above result demonstrates clearly that the indophenol synthesis by the heart muscle occurs more intensely than by the Tawara's bundle. Using dimethyl-para-phenylendiamine as in the case with Schultze's staining method, a similar result was obtained, though the numerical data as above cannot be given here owing to the lack of suitable standard colour solution. At any rate the colour intensity when compared; showed in an unmistakable manner that the heart muscle revealed 4-10 times stronger Nadi-reaction than the Tawara's bundle.

### III. CONTENTS OF SULFHYDRYL COMPOUNDS OF THE AURICULOVENTRICULAR JUNCTIONAL SYSTEM OF HEART.

The discovery of glutathione by Hopkins (1921) has aroused much interest in connection with the oxidative activity of the tissue. It has been tacitly assumed that the glutathione contents of any tissue run parallel to its metabolic activity. It was, there-

fore, intended in the following experiment to determine the glutathione content of the conducting system of heart and to compare with that of the heart muscle.

For the determination, Okuda's iodometric method (1927) was followed in the main. It runs as follows:

About 0.5 gm. Tawara's bundle of ox, carefully isolated from its surrounding tissue, was weighed out exactly and finely ground up with 2.0 cc. of distilled water and a small portion of pure sand in the mortar. The paste was thoroughly mixed with 2.0 cc. of N. sulfosalicylic acid, then, put aside for 30 minutes to ensure the complete extraction of glutathiones. The whole was transferred into the centrifuge tube with the aid of 2 cc. of half normal sulfosalicylic acid and submitted for centrifugalisation. The supernatant was filtered through a dry filter paper (4 cm. diameter). On the precipitate the extraction was repeated twice more, each time using 4 cc. of sulfosalicylic acid. All the extracts were also passed through the same filter paper. Finally the paper and the precipitate were washed with each 1 cc. of 2% potassium iodide and normal sulfosalicylic acid, followed further by 2 cc. of half normal sulfosalicylic acid. Then the whole extract was put in the thermostat of 18°C and after the addition of 2 drops of 1% starch solution as indicator was titrated with m/1500 iodate solution, which contained sulfosalicylic acid in the concentration of half normal. The titrating value was recalculated into cysteine basing on the empirical data obtained at the standard condition of the titration in respect to the temperature, volume and acidity.

The results are summarised in Table IV.

It is obvious from Table IV that sulfhydryl compounds of Tawara's bundle is far less than that of heart muscle.

#### IV. THE OXYGEN REQUIREMENT OF THE AURICULOVENTRICULAR JUNCTIONAL SYSTEM.

The foregoing experiments on the auriculoventricular junctional system point out clearly that the metabolic process of this

TABLE IV.

The contents of sulfhydrylcompounds of Tawara's bundle and heart muscle.

No. of ox	Sort of muscle	Weight of muscle gm.	Reduced glutathione indicated as cysteine mg. per 100 gm. of tissue.	Total glutathione indicated as cysteine mg. per 100 gm. of tissue.
1	Heart muscle	0.67	108.4	122.7
	Tawara's bundle	0.67	80.26	
	Heart muscle	0.67		
2	Heart muscle	0.50	110.4	120.8
	Tawara's bundle	0.32	77.5	
	Heart muscle	0.50		
3	Heart muscle	0.50	112.0	120.3
	Tawara's bundle	0.44	88.49	
	Heart muscle	0.50		
4	Heart muscle	0.50	104.2	
	Tawara's bundle	0.50	76.91	
5	Heart muscle	0.43	100.8	117.3
	Tawara's bundle	0.43	72.02	
	Heart muscle	0.43		
6	Heart muscle	0.50	119.9	
	Tawara's bundle	0.50	74.78	
7	Heart muscle	0.43	110.3	101.5
	Tawara's bundle	0.42		
	Heart muscle	0.43		

tissue should be decidedly less than that of heart muscle. In order to raise the conclusive evidence the oxygenuptake of the system was determined. In this respect Buadze and Wertheimer(1928) and Kolmer and Fleischmann (1928), as already referred to, have made the observation that the oxygen consumption of the conduct-

ing system is far less than that of the heart muscle. Since this is the most important point in the discussion of the oxidative activity of any tissue, the author dared to repeat once more and obtained the result as indicated in Table V, which stands in full confirmation of the works of the previous investigators.

The method applied here, briefly mentioned, is as follows: An aliquot portion of the Tawara's bundle of ox heart, kept alive in

TABLE V.  
The oxygen uptake of the Tawara's bundle and the trabecular muscle of ox heart.

No. of ox	Weight of muscle. gm.		Oxygen uptake per gm. of tissue, 2 hours cc.	Remarks
	Tawara's bundle	Heart M		
1	0.31	0.12	89.9 275.0	kept alive at 37°C 4 hours after killing
2	0.27	0.14	85.2 283.0	kept alive at 37°C 6 hours after killing
3	0.25	0.17	302.3 419.7	kept below 10°C 2½ hours after killing
4	0.1	0.1	356.7 854.3	kept below 10°C 2½ hours after killing
5	0.25	0.30	428.0 482.0	kept below 10°C 5 hours after killing
6	0.17	0.17	466.2 598.8	kept below 10°C 2½ hours after killing
7	0.23	0.25	241.0 289.0	kept below 10°C 5½ hours after killing
8	0.15	0.12	175.3 538.5	kept below 10°C 5½ hours after killing

the Soejima's solution at 37°C or kept below the temperature of 10°C for 2-5 hours after killing, was isolated carefully and brought into the Soejima's solution in the respirometer vessel of Warburg. (Soejima's solution which was proved as the most suitable perfusing solution for the maintaining of the automatic contraction of ox heart, has the following composition: NaCl 8.0, CaCl<sub>2</sub> 0.3, KCl 0.15, MgCl<sub>2</sub> 0.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.12, NaHCO<sub>3</sub> 1.0 and H<sub>2</sub>O 1000.0.). The oxygenuptake was measured in the usual way with the technique of the differential manometer. For the comparison the oxygenuptake of the trabecular muscle of right ventricle of the same heart was measured.

#### DISCUSSION.

According to the current views on the tissue oxidation the chemical process involved may be principally governed by two factors, namely by dehydrogenase and by oxidase. For the proper understanding of the tissue oxidation, therefore, the actual knowledge on the behavior of each ferment in the tissue is important.

Vernon (1911) mentioned that there is a good parallelism between the oxidase contents and the respiration of the tissue. Gierke (1911) and Graeff (1922) demonstrated that Nadi-reaction of the tissue runs parallel to its metabolic activity. This finding was again verified by Ikeda (1914) on muscles of various kinds: Katsunuma (1924) made the interesting observation on frogs that the leg muscles during hibernation showed a marked decrease in the oxidase content, while the heart and the cortical portion of the kidney, which should continue their functions even in winter sleep, show no such a change. He found also that the uterus and the Fallopian tube of the summer frog became rich in oxidase contents.

All the facts as above enumerated point out that the close connection exists between the activity of the tissue and the oxidase contents. But it should be taken into consideration that the oxidase activity does not come into prominence in the tissues where the

reductase exerts an overwhelming effect. For instance, the liver, which is the most active metabolic organ, shows an inferior capacity in the indophenolblue synthesis. In this sense the parallel determination of oxidase and dehydrogenase of the tissue is important.

As revealed in the above experiments both ferments of the auriculoventricular junctional system is decidedly scarce in comparison to that of the heart muscle. Therefore, the observation made by Katsunuma that the conducting system of heart gives an intense indophenolblue reaction cannot be interpreted in the sense that a more brisk oxidative process occurs there. The process of Nadi-reaction in the histological sense can be governed by two factors, namely by the formation of the dye and by its fixation on a stainable substance in the tissue. As the Schultze's reagent is inclined to produce the dye by spontaneous oxidation, the positive Nadi-reaction may be often produced even when the tissue is lacking in the oxidase, but rich in the stainable substances. A possible explanation of Katsunuma's observation, therefore, may be sought in the line that the bundle is rich in chemical substance readily stained by the dye. In this regard, Oppenheimer (1926) expressed his opinion based on the experiment carried out by Reed (1915) that the oxidase granula is either a simple precipitation of the dye in the protoplasm or a staining of the granula, if it exists, which is not connected at all with the localisation of the oxidase.

After the above survey, the author's observation that the system is scarce in dehydrogenase and oxidase, leads reasonably in spite of its intense Nadi-reaction to the conclusion that the metabolic activity of the system is far inferior to that of heart muscle. An additional evidence for this conclusion is brought by the experimental results that the system consumes less oxygen than heart muscle. Moreover this may find its further support in the comparison of the content of sulphhydryl compounds in Tawara's bundle with that of the heart muscle. According to the opinion expressed recently by Keilin (1929), cytochrom acts as a carrier between dehydrogenase and oxidase in the respiration of cells. The fact

that Tawara's bundle is markedly poor in myochrom as compared with heart muscle, may favor, also the above conclusion.

### SUMMARY.

1. The activity of dehydrogenase and oxidase of the auriculoventricular junctional system was quantitatively estimated and compared with that of heart muscle, with the conclusion that the former is far inferior to the latter in the activity of both ferments.

2. It was found also that the content of sulfhydryl compounds of the auriculoventricular junctional system is less than that of the heart muscle.

3. It was proved moreover that Tawara's bundle consumes far less oxygen than the heart muscle.

4. From these experimental results it is reasonably concluded that the metabolic activity of the auriculoventricular junctional system is much inferior to that of heart muscle.

The author is deeply indebted to Prof. Keizo Kodama and Prof. Makoto Ishihara for kind advice throughout this investigation.

### REFERENCES.

- Buadze, S. u. Wertheimer, E. (1928): *Pflügers Arch.*, **219**, 233.  
 Gierke, V. (1911): *Münch. med. Wochenschr.*, 1911, 2315.  
 Graeff, S. (1922): *Ziegler's Beitr.*, **70**, 1.  
 Hopkins, F. G. (1921): *Bioch. Journ.*, **15**, 286.  
 Hopkins, F. G. (1926): *Scand. Arch.*, **49**, 57.  
 Hopkins, F. G. and Dixon, M. (1922): *Jl. of Biolog. Chem.*, **54**, 527.  
 Ikeda, (1924): *Zentralbl. f. Bioch.*, **16**, 204.  
 Katsunuma, S. (1924): *Intrazelluläre Oxydation u. Indophenolsynthese*, Verlag von Gustav Fischer.  
 Keilin, D. (1929): *Proc. Royal Society*, **104**, 206.  
 Kolmer, W. u. Fleischmann, W. (1928): *Pflügers Arch.*, **218**, 530.  
 Okuda, Y. (1925): *Journ. of Biochemistry*, **5**, 201.  
 Okuda, Y. (1927): *Nihon Nogei Kagakukwaishi*, **3**, 1097.  
 Oppenheimer, C. (1926): *Fermente u. ihre Wirkungen*, S. 1294.

- Oppenheimer, C.: Ebenda, S. 1795.  
Reed, G. B. (1915): Journ. Biolog. Chem., **22**, 99.  
Shin, K. (1929): Fukuoka Ikadaigaku Zasshi, **23**, 789.  
Soejima, T. (1928): Fukuoka Ikadaigaku Zasshi, **21**, 79.  
Staemler, M. u. Sanders, W. (1925): Virchows Arch., **159**, 595.  
Thunberg, T. (1920): Scand. Arch., **35**, 163.  
Vernon, H. M. (1910): Journ. Physiol., **42**, 40.

## BIOCHEMICAL STUDIES ON THE AURICULO- VENTRICULAR JUNCTIONAL SYSTEM OF HEART.

### III. The Phosphatide and the Cholesterin content.

By

KAGEYU YAMAZAKI.

(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,  
Fukuoka. Director: Prof. Keizo Kodama.)

(Received for publication, July 14, 1930.)

#### INTRODUCTION

In the previous communication the author presented the conclusive evidence in favor of the postulation that the metabolic activity of the auriculoventricular junctional system of heart is small, notwithstanding its intense Nadi-reaction. Then the question arises what is the essential feature of this reaction. In this respect an intimate relation between the reaction and the lipid-content of the tissues has been often discussed. Dietrich (1908) expressed the idea that the tissue-lipoid has an affinity for the indophenoldye, so that the intense Nadi-reaction means rather an abundance in the lipid content. Haeberli (1916) maintained, however, that the Nadi-reaction is not entirely correlated with the lipidreaction, though he admitted the staining of the lipid with the indophenoldye. Sehrt (1927) made an extensive study upon the relation of the oxidase reaction to the lipid of leucocyte and was impressed with the close relationship between them, basing his opinion on the following observations:

- 1) The distribution, the form and the percentage content of the oxidase granula coincide with that of lipidgranula.
- 2) Both granula were affected equally by the various organic solvents of fatty substance.
- 3) The pure lipid preparations behaved as a catalytic agent for the Nadi-reaction in vitro.

Quite recently Gutstein (1929) published an interesting paper in which he stated that the water soluble phosphatide from soya-beans is endowed with an ability of inducing Nadi-reaction *in vitro*.

In this connection, reference may be made also to the paper of Tsuneyoshi (1927) which stated that the oxygen uptake of the muscles runs parallel with their lipid contents, which, according to Kakiuchi (1927), was chiefly associated with mitochondria of the muscle cells.

All of the works as above enumerated clearly demonstrate that the lipid of the tissue may be responsible for its Nadi-reaction in a duplicate sense, either of inducing the reaction or of fixing the dye produced. It is interesting, therefore, to see whether the auriculoventricular system may owe its intense Nadi-reaction to the lipid contents or not. The present paper is chiefly concerned with this problem.

#### EXPERIMENTS.

The Tawara's bundle of left ventricle was carefully isolated from the ox heart three hours after killing of the animals. The water on the surface was wiped off with gauze and the bundle was minced to paste by scissors. An aliquot portion of this paste was weighed out by means of the torsions balance, then treated with the mixture of absolute alcohol and ether (2:1), the extraction being continued for 24 hours. As the control a portion of the muscle from the mediastinal wand between both ventricles was treated in the same manner.

On this extract the lipid content was calculated as lecithin by multiplying 26 to the amount of phosphorus, which was determined by the method of Bell-Doisy after being ashed by the Neumann's method.

The total cholesterin content was estimated colorimetrically, according to Liebermann's color reaction, after saponifying the compound cholesterin with sodium ethylate.

The results are summarised in Tables I and II.

TABLE I.

The cholesterin content of Tawara's bundle and Heart muscle.

No. of ox	Weight of muscle mg.		Phosphatide content per 100 gm. of tissue mg.
	Tawara's bundle	Heart M.	
1	162	153	567.8 656.9
2	236	203	315.4 699.4
3	215	271	398.7 638.7
4	212	231	338.7 551.7
5	181	226	498.6 798.7
6	164	273	521.6 596.7
7	292	261	315.3 831.6
8	246	284	290.3 736.2
11	187	269	542.9 634.5
12	323	313	215.2 584.5
13	152	282	551.8 624.7
14	198	202	525.2 717.1
Average	Tawara's bundle		423.6
	Heart muscle		680.8

TABLE II.

The Phosphatide content of Tawara's bundle and heart muscle.

No. of ox	Weight of muscle mg.		Cholesterin content per 100 gm. of tissue mg.
	Tawara's bundle	Heart M.	
1	145	150	122.4 104.6
2	196	244	106.4 93.2
3	300	270	125.0 96.0
4	323	289	130.4 134.7
7	258	258	118.9 129.2
8	228	233	176.8 174.2
9	196	212	130.2 134.7
10	284	260	93.2 111.2
11	205	289	159.1 145.6
12	304	333	111.7 139.2
13	244	204	80.9 128.9
14	156	213	179.1 149.8
Average	Tawara's bundle		127.8
	Heart muscle		128.4

### CONCLUSION.

1. The phosphatide content of the auriculoventricular junctional system of ox heart is less than that of the heart muscle. Therefore, the intense Nadi-reaction, revealed by the auriculoventricular system can not be explained by the abundance of phosphatide.
2. The cholesterin content of the auriculoventricular system is nearly equal to that of the heart muscle.

The author wishes to express his heartiest thanks to Prof. Dr. Keizo Kodama and Prof. Dr. Makoto Ishihara for their kind advice throughout the course of the investigation.

### REFERENCES.

- Dietrich, A. (1908): Zentralbl. allg. Path., **19**, 3.  
Gutstein, M. (1929): Bioch. Zeitschr., **207**, 177.  
Haeberli, E. (1916): Virchow. Arch., **221**, 331.  
Kakiuchi, S. (1927): Journ. Biochemistry, **7**, 263.  
Sehrt, (1927): Histolog. u. Chemie d. Lipoiden d. weissen Blutzellen u. ihre Beziehung zur Oxydasereaktion. Verlag. von Georg Trieme, 1927.  
Tsuneyoshi, K. (1927): Journ. Biochemistry, **7**, 227.



## BIOCHEMICAL STUDIES ON THE AURICULO- VENTRICULAR JUNCTIONAL SYSTEM OF HEART.

### IV. Studies on the Anaerobic Oxidation of t Auriculoventricular Junctional System.

By

KAGEYU YAMAZAKI.

*(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,  
Fukuoka. Director: Prof. Keizo Kodama.)*

(Received for publication, July 14, 1930.)

#### INTRODUCTION.

As definitely proved in the foregoing experiments, the oxidative process in the auriculoventricular junctional system is less significant when compared with that of the heart muscle. This might lead to the conception, which was already expressed by Kolmer and Fleischmann (1928), that the system owes the energy of its rhythmic automatic contraction to the anaerobic oxidation of the glycogen. In this connection Pick and Rigler (1924) made an interesting observation that this automaticity is not appreciably affected in the Ringer's solution deprived of oxygen supply nor even in that containing cyanic acid.

Since the cyanic acid is usually believed to paralyse the oxydase in the living tissue, the attitude exhibited by the system may be interpreted as indicating that the aerobic oxidation has no bearing with its contraction. But as was discussed quite recently by Dixon and Elliot (1929) there exists a certain system, the oxygen consumption of which is not influenced by cyanide. If this is the case with the auriculo-ventricular junctional system, the metabolic process herein should be, at least partially, aerobic and the observation made by Pick and Rigler in relation to the oxygen supply

should be ascribed to the incomplete anaerobic condition. In a tissue, which requires a minute amount of oxygen for the maintenance of normal activity, a trace of oxygen, which can not be removed in a simple manner, may often be sufficient. In the following experiments, the author intended to investigate in a more precise manner how far the heart conducting system can endure the oxygen lack for keeping the rhythmic automatic contraction.

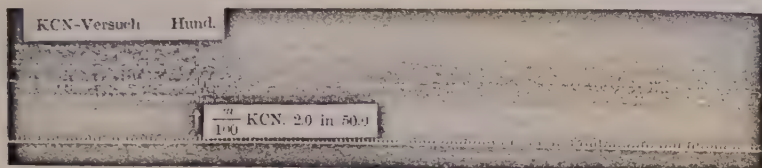
### EXPERIMENTS.

#### 1. *Influence of cyanide upon the automacy of the auriculo-ventricular junctional system.*

As material the Tawara's bundle and the spurious tendon of dog were employed, both being isolated from the heart immediately after killing the animal by bleeding or strangling under narcosis with morphine. The strip of this tissue was suspended in Locke's solution in a glass cylinder of 120 cc. capacity, which was immersed in the thermostat kept at 37°C. The automatic contraction, which usually set in within 30 minutes after the commencement of the experiment, was recorded on a sooted paper in a usual manner. During the experiment oxygen was bubbled through the Locke's solution at a slow but constant rate. When the contraction went on at a steady and regular rhythmus, M/100 KCN was added into the perfusing solution to the endconcentration of M/2500 or M/5000 per liter, and the observation was continued.

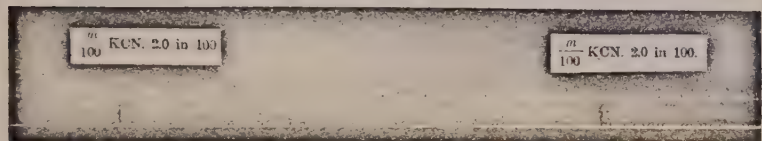
All the experiments showed that KCN in any concentration employed was unable to bring about the complete standstill of the automatic movement. But its poisonous effect usually became manifest, though to an inconsiderable degree, in the reduction of the amplitude of the contraction, often with a slightest augmentation at the beginning, while the frequency of the contraction was scarcely influenced. In a few examples, however, neither the amplitude nor the frequency was affected appreciably. Some of the typical examples are given in Fig. 1 and 2.

Fig. 1. Influence of the M/2500 KCN upon the automatic contraction of Tawara's bundle.



Remarks: Time-mark indicates 2".

Fig. 2. The same.



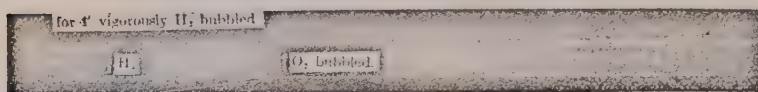
2. *Influence of the oxygenlack upon the automatic contraction of the Tawara's bundle poisoned with KCN.*

In order to prove that the KCN-poisoned tissue owes its contractions-energy to the anaerobic oxidation or to the aerobic, the passage of oxygen through the perfusing solution was replaced with hydrogen purified with utmost precaution. It was expected in the experiment that if the strict anaerobic oxidation prevailed in the metabolism of the tissue, no appreciable change might be produced.

All of the examples indicated that the vigorous aeration of the hydrogen for four minutes long resulted in the slight decrease in the amplitude and in the frequency of the contraction. This recovered, however, again fairly promptly almost to its former size and frequency, as soon as the solution began to be bubbled with oxygen. Fig. 3 illustrates one of these examples.

From these results it may be concluded that Tawara's bundle poisoned with KCN can still utilize oxygen to maintain its automatic contraction and that the replacement of oxygen with hydrogen can not bring about the complete arrest of the contraction.

Fig. 3. Influence of the oxygen lack upon the automatic contraction of the Tawara's bundle poisoned with M/2500 KCN.



Remarks: Time-mark indicates 2".

### 3. The oxygen uptake of Tawara's bundle.

To do justice to the above conclusion, the actual consumption of oxygen of Tawara's bundle poisoned with cyanide was measured by applying the technique of Warburg.

As material, the left ventricular Tawara's bundle was isolated as purely as possible from ox heart and was introduced into the main compartment of Warburg's vessel which held 5 cc. of Soejima's solution, containing KCN in the concentration of M/3000 per liter. The vessel attached to the manometer was shaken at a constant pitch in a thermostat kept at 37°C and at the end of two hours the reading of manometer was taken. Some experimental results together with control, are shown in the following table.

TABLE I.  
The oxygen uptake of Tawara's bundle poisoned with M/3000 KCN.

No. of ox	Weight of Tawara's bundle gm.	Consumed oxygen per 1 gm. of tissue. cmm.
1	0.19	59.5
2	0.17	83.2
3	0.25	57.0
4	0.22	131.0

The same of the intact Tawara's bundle.

No. of ox	Weight of Tawara's bundle gm.	Consumed oxygen per 1 gm. of tissue. cmm.
5	0.24	178.0
6	0.17	301.9

Though the above data show the individual fluctuations of not less magnitude yet we can tacitly assume that potassium cyanide of the given concentration cannot inhibit completely the oxygen consuming power of Tawara's bundle. Roughly speaking, 30-40 percent of the normal uptake was still retained by the poisoned tissue.

4. *The automatic contraction of the spurious tendon of dog heart in Locke's solution rendered as free from oxygen as possible.*

The foregoing experiment clearly demonstrates that the Tawara's bundle takes up oxygen even in the presence of cyanide and contains its automacy. Then it seems to be fundamentally important to know whether this automacy can be completely abolished when the oxygen supply is cut off as completely as possible. Since the methods, such as bubbling with nitrogen or hydrogen, which had been applied hitherto for the purpose of removing the oxygen from the perfusing solution, seemed to be insufficient to realise a medium free from oxygen, the following method was adopted. The tissue was placed together with 10 cc. of Locke's solution in one arm of the glass tube of the reversed Y form provided with the gummi-stopper, which carries a glass tube with tap for evacuation. The vessel was immersed into the thermostat kept at 37°C. When the automatic contraction of the tissue began to proceed in a regular manner, the freshly prepared alkaline pyrogallie acid was introduced into another arm and the tube was evacuated to 5 mm. Hg. pressure for 5 minutes. The rate of the automatic contraction of the tissue was counted after certain intervals of time under the magnifying lense. It was found that the contraction proceeded regularly over 2 hours and then gradually fell off. One of the typical examples was given in Table II.

From this result it is apparent that the spurious tendon of the heart can continue its contraction for certain length of time in a milieu practically free from oxygen, though the author does not

TABLE II.

The left ventricular spurious tendon of a female dog weighing 6 kilogram was used here as material.

Time	5'	50'	90'	120'	150'	190'	240'	270'
Frequency per min.	26	25	20	18	24	32	6	0
Amplitude	regular & great	"	"	"	a little irregular	"	irregular & small	

dare to draw the conclusion that the small yet visible contractions were realised by the anaerobic oxidation, because a trace of oxygen still retained in the solution might suffice for such a tissue as the spurious tendon, which uses up a small amount of oxygen for the metabolic process.

## SUMMARY.

1. The auriculo-ventricular junctional system of heart is very resistant against cyanide.
2. The auriculo-ventricular junctional system poisoned with M/2500 KCN can consume oxygen to a certain extent.
3. The auriculo-ventricular junctional tissue does not give up its automatic contraction in Locke's solution practically free from oxygen.

The author wishes to express his heartiest thanks to Prof. Keizo Kodama and Prof. Makoto Ishihara for their kind advice throughout the course of this investigation.

## REFERENCES.

- Dixon, M. and Elliot, K. A. C. (1929): *Biochem. J.*, **23**, 812.  
 Kolmer, W. u. Fleischmann, W. (1928): *Pflüger's Arch.*, **218**, 530.  
 Pick, E. P. (1924): *Klin. Wochenschr.*, **3**, 662.

## STUDIES ON GLYOXALASE.

By

FUTOSHI SAKUMÁ.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical School, Niigata.  
Director: Prof. N. Ariyama.)

(Received for publication, June 25, 1930.)

Much discussion has centered around the question as to the importance of methylglyoxal in the sugar metabolism of plant and animal bodies. Neuberg has accumulated the bulk of evidence for the unquestionable appearance of methylglyoxal in the course of sugar metabolism. Recently Neuberg and his associates (Neuberg and Kobel, 1929 i) pointed out the 100% conversion of hexose-diphosphate to methylglyoxal by the well washed co-enzyme-free bacillus (*Bacillus Delbrücki*), and about 80% conversion by the washed yeast (Neuberg and Kobel, 1929 ii). On the other hand Toenniessen and Fischer (1926), Ariyama (1928) and Vogt (1929) noticed the formation of methylglyoxal from the above substrate in the presence of animal tissues. The yield of methylglyoxal was, however, under 30% of the theory in any of these cases.

One of the most interesting facts emerging from the study of methylglyoxal is the presence of glyoxalase in the plant and animal world. The wide distribution of the enzyme, which converts glyoxals energetically into the corresponding hydroxy acids, seems to afford a strong indirect support for the methylglyoxal-theory. Glyoxalase has been a topic of study since the investigations of Dakin and Dudley (1913) and Neuberg (1913), and contributions towards its elucidation have been made by Foster and Woodlow (1924), Foster (1925), Dudley (1913), Kuhn and Heckscher (1926) and Ariyama (1928). These researches, however, still leave extensive room for further study. The in-

vestigation of which the results are now communicated was carried out with the object of studying the distribution of glyoxalase in plant and animal bodies, the behaviour of the co-enzyme necessary for the glyoxalase activity, and the nature of "antiglyoxalase."

#### METHOD OF METHYLGLYOXAL DETERMINATION.

We have at present three methods available for the quantitative detection of glyoxals: (a) the conventional method of weighing *en masse* the phenyl- or nitrophenylosazones or semicarbazones of the glyoxals; (b) the iodometric method of Kuhn and Heckscher (1926); and (c) the colorimetric method introduced by Ariyama (1928). The last mentioned method is based upon the fact that glyoxals acquire, by the addition of cyanide, such a great increase of reducing intensity in alkaline solution, that they cause the color development of Benedict's arsenophosphotungstic reagent. None of the possible intermediate products of sugar metabolism, such as form-, acet-, glycol-, and glyceric aldehyde, lactic and pyruvic acid or free hexoses, interfere with the determination by developing the blue color, with the exception of dihydroxyacetone which gives about 20% of the color of methylglyoxal of the same concentration. This method was adopted in the writer's experiments for the determination of methylglyoxal, as it seemed to furnish the most useful method available at present. Since the only derivative of the glyoxal series calling for any comment in sugar metabolism was methylglyoxal, this was used exclusively as the substrate. Methylglyoxal was prepared from dihydroxyacetone (Oxanthin, Hoechst) according to the method of Fischer and Taube (1924) or of Fischer and Feldmann (1929).

#### THE DISTRIBUTION OF GLYOXALASE IN PLANT AND ANIMAL BODIES.

The distribution of glyoxalase was examined throughout plant and animal tissues under normal and pathological conditions. For the ease of comparison the unit of the glyoxalase activity was

provisionally taken as that of 1 gm. of the tissue which converts 20 mg. of methylglyoxal in 20 minutes at pH 7.0 and 37.5°. Glyoxalase was always prepared in the following way. To one part of finely minced fresh tissues (usually rabbit's liver) were added five parts of distilled water. After an hour's standing at room temperature with occasional stirring the mixture was filtered. This extract was used as the source of the enzyme. The results listed in Table I represent the distribution of the enzyme in the tissues of various animal classes covering mammals, avians, fish and amphibians. The salient fact brought out by these experiments is that the distribution did not show any noticeable fluctuation in animals of the same class, so long as they were kept under normal conditions. As the table reveals, we cannot distinguish the mammalian tissues from the avian in their glyoxalase contents. The same evidence was also observed between fish and amphibians. Yet there was a definite distinction between the warm- and cold blooded animals in the glyoxalase distribution, the main difference being the lower glyoxalase content of the liver of the latter. At any rate, the common characteristic of all classes was that the liver abounds with the enzyme in comparison to other tissues. The egg, both white and yolk, consumed methylglyoxal to a slight degree. Glyoxalase was never excreted in the urine under any circumstances.

The influence of pathological conditions on the glyoxalase contents of animal tissues was examined. The animals used were: rabbits starved for 5 and 10 days; rabbits starved for 10 days, followed by an injection of strychnine for the purpose of reducing the sugar storage in the tissues to the minimum limit; insulinized rabbits with and without hypoglycemic convulsion; completely phlorhizinized rabbits; rabbits made hyperglycemic by adrenalin injection; phosphorous-intoxicated rabbits and depancreatized dogs. The findings, summarised in Table II, provide evidence in support of the assumption that the glyoxalase contents decrease definitely when the tissues succumb to continuous deprivation of sugar

(fasting, phlorhyzinisation, especially fasting+strychnine) with the exception of the cases where the decrease of sugar takes place rather suddenly (insulin injection). To take a general survey of the outcome of the experiments, it is obvious that the liver (and the brain) held its glyoxalase rather tightly, whereas the other tissues readily lost the enzyme. For instance, the loss of liver glyoxalase was only 30% in the strychninized animals, while that of the other tissues was from 70 to 80%. It should be emphasized that the young sarcom tissue of the rabbit contained as much glyoxalase as the normal liver. This fact confirms Warburg's finding (1924) that the liver of the rat converts methylglyoxal to lactic acid at the same rate as the carcinom tissue, though the glycolytic power of the former is only one tenth of the latter.

The occurrence of glyoxalase in the plant world has been brought to light by the works published from Neuberg's laboratory. In the author's experiments, glyoxalase was detected most richly in the growing young tissues and in the fertile parts such as bud, seeds or subterranean stem. A series of experiments was carried out with the aim of studying how the glyoxalase content of seeds might change as the germination proceeded. For this purpose soy-beans were kept moistened at 25° and the glyoxalase contents of bud, bean-rest and whole bean including bud and root were examined daily. The relation between the glyoxalase contents and the process of germination is shown in Chart I, the activity of the enzyme being revealed by the decrease of added methylglyoxal in the percentage. The chart brings out that the glyoxalase of the bud increased rapidly up to the 7th day of the germination and was succeeded by a subsequent declination, while the bean-rest showed only an abortive increase in the first few days. These two curves determine naturally the inclination of the curve for the whole bean, the enzyme content of which increased, as a matter of fact, with moderate velocity till the 7th day. The young root was enzyme-free.

## POWDERED GLYOXALASE PREPARATION.

One of the obstacles encountered in the study of glyoxalase was the relatively rapid loss of its activity during storage, even at a low temperature. To obviate this, the preparation of dry powdered enzyme was undertaken. For this purpose the use of alcohol had to be limited, as it exerted, progressively with the time of contact with the enzyme, a definite inhibitory effect on glyoxalase. Thus half an hour's treatment of the fresh rabbit's liver with absolute alcohol caused 20% more loss in the activity in comparison to the tissue treated for 5 minutes (Table III). Ether was proved to be quite harmless to glyoxalase. The preparation of the dry powder was set up from the information gained from the facts mentioned above, by treating one part of the fresh rabbit's liver with 4 parts of absolute alcohol for 5 minutes, then, with ether and finally drying it in the desiccator.

The extraction of the enzyme from the powder thus prepared was achieved most effectively by shaking it with a neutral liquid for two hours at room temperature or for an hour at 37°C (Table III and IV). The liquid, the reaction of which was on either side of the neutral point, was inferior to the neutral one in its effect to extract the ferment out of the powder. As to the true effect of pH on the extraction, however, nothing can be deduced, inasmuch as it is open to question, whether such liquids extracted actually less enzyme or whether they destroyed the enzyme after its extraction. Preference may be given to the latter suggestion, in view of the sensitiveness of glyoxalase even to a momentary exposure to unfitted reaction.

The powder, prepared as stated above, retained 70% activity of the original fresh tissue and could be kept for at least four weeks without any loss of its power.

## CO-ENZYME FOR GLYOXALASE.

In their recent works, Neuberg and Kobel (1929 i, ii) noticed that well washed lactobacillus or yeast, which was capable of con-

verting hexose-diphosphate to methylglyoxal but incapable of taking a step further to form lactic acid from methylglyoxal, acquired the ability of producing lactic acid when boiled yeast juice was added to it. This was interpreted by them as indicating that co-enzyme was indispensable for the enzymic production of lactic acid from methylglyoxal. Comprehensive information about more detailed characteristic of co-enzyme is very desirable.

With the object of furthering our knowledge in this direction, experiments were begun with the study of the relation between glyoxalase and co-enzyme. The co-enzyme solutions were prepared by boiling 10% watery suspensions of liver-, muscle- and kidney-hash of the rabbit for a suitable period. The co-enzyme function of these solutions was tested on fresh glyoxalase prepared from liver and muscle of the rabbit. As is shown in Table V, more co-enzyme came out of the tissues as the time of boiling was prolonged, and the liver was the richest source of co-enzyme, followed by muscle and kidney, the ratio of their co-enzyme content being 1.0:0.3:0.1. The fact that the accelerating effect of co-enzyme on muscle glyoxalase was stronger than that on liver glyoxalase appears to lead to the following assumption: The inferiority of muscle to liver in its glyoxalase content may be partly understood on the ground that the co-enzyme content of the former is probably short for the adequate action of its glyoxalase. The co-enzyme activity of boiled juice increased, as was expected, with a rise in its amount.

On the basis of analogy of the dialysability of the common co-enzyme it was supposed that co-enzyme of glyoxalase would be also dialysable. As a matter of fact, glyoxalase lost its total activity when dialysed through collodion membrane against distilled water for 5 hours at room temperature but recovered definitely with the addition of boiled liver juice. (Table VI). The activity of the enzyme increased far beyond its original value when a large amount of co-enzyme was given.

Zaleski's (1928) study on plant aldehydase has brought to

light a very interesting case of the co-enzyme problem. He observed that acetaldehyd consumption by soy-bean increased as germination proceeded and that this difference in aldehydase activity was, however, readily equalized by the addition of sufficient amount of co-enzyme (boiled dry-yeast juice). This finding may be indicative, according to his interpretation, of the increase of co-enzyme rather than of aldehydase itself with the progress of germination. By way of analogy, it is highly probable that the fluctuation of the glyoxalase content of soy-bean during its germination, as indicated above in the study of distribution of glyoxalase in plant tissues, could be attributed to the change of the co-enzyme content rather than to that of the glyoxalase itself. The findings of experiments listed in Table VII support this assumption, so far as the glyoxalase activity of soy-bean increased up to the 8th day of germination, followed by a subsequent decrease, whilst this fluctuation was completely equalized by the addition of excess of boiled liver juice.

By way of analogy and in view of the fluctuation of the co-enzyme content in the plant seed during germination, it would appear not unlikely that the co-enzyme contents of animal tissues might also change under pathological conditions. This expectation was fulfilled, as the liver of the 10 days-starved rabbit contained much less co-enzyme than the normal liver, and the reduced activity of glyoxalase of the starved liver recovered remarkably by the addition of co-enzyme. For the comparison of the co-enzyme contents in starved and normal tissues of the rabbit, the boiled juice of starved and normal livers (co-enzyme solution) was added to the fresh glyoxalase solution prepared from the normal liver, and the accelerating effect of the boiled juice was examined. The data, listed in Table VIII, show that the co-enzyme content of the starved liver was 60-70% of that of the normal liver. On the other hand, there was observed a distinct difference in the accelerating effect of co-enzyme on the action of glyoxalase obtained from normal and starved liver. The rate of acceleration caused by the same amount of co-enzyme was 20 times greater in the glyoxalase of the starved

liver than in that of the normal one. All these findings are best understood on the ground that starvation deprives the tissue of the co-enzyme (not glyoxalase itself), or at least a greater quantity of co-enzyme is lost in comparison with glyoxalase.

#### CO-ENZYME-LIKE SUBSTANCES.

Euler and Myrbäck (1929) claim that co-zymase of yeast fermentation is adenine nucleotide in a special form. In the course of studies on glyoxalase, the present writer often observed that there were several chemical substances which accelerated the glyoxalase activity. Some of these substances acted, however, like co-enzyme only in appearance, in consequence of their direct action on the substrate (methylglyoxal). Glucose, which is indifferent to methylglyoxal, was a wonderful cure for the glyoxalase, which had been made completely inactive by dialysis. The addition of 5% glucose to such glyoxalase caused 32% recovery of its activity (Table IX). Glucose also assisted fresh glyoxalase in its activity tolerably well (Table X). The addition of such a small amount as 0.0005% glucose to the fresh glyoxalase-methylglyoxal system caused an indication of acceleration, the optimum dosis of glucose being 0.2% where 56% acceleration was observed. The acceleration was by no means confined to glucose, as polysaccharides, which contain glucose in their molecules, like maltose, lactose, sucrose or glycogen, had also marked accelerating effect, the optimum sugar concentrations being 0.05–0.2% (Table XI). It should be emphasized that glyoxalase did not respond to the addition of hexoses other than glucose even in a slight acceleration of its activity. Pentoses, too, had moderate co-enzyme-like action on glyoxalase. The sugar samples used were of the purest quality available in the market (Merck's extra pure samples).

In this connection, the influence of several aldehydes, ketones and lactic acid on glyoxalase was examined. As is shown in Table XII, acet- and formaldehyde and lactic acid manifested slightly

inhibitory effect, while acetone and dihydroxyacetone showed a moderately stimulating action on glyoxalase.

In spite of the indispensability of phosphate in glycolysis, it was observed, beyond doubt, that the same phosphate inhibited the glyoxalase action (Table XIII). This inhibition originated in the direct effect of phosphate on glyoxalase but not in the chemical interaction between phosphate and methylglyoxal or in the harmful effect of phosphate on the blue color production. Thus the previous treatment of glyoxalase with phosphate caused a marked loss of the activity and more so when the duration of the treatment was prolonged (Table XIV). On the other hand the previous contact of methylglyoxal with phosphate did not show any inhibitory effect on the rate of methylglyoxal destruction by glyoxalase.

In the light of Euler and Myrbäck's work (1929), it is of special interest to examine nucleic acid and its decomposition products in their co-enzyme-like action. The addition of nucleic acid, guanylic acid, guanosine, guanine, adenosine, adenine and uridine affected the activity of dialysed glyoxalase in various ways. Nucleic acid accelerated the action of glyoxalase, which had been dialysed for two hours, to a slight degree (Table XV). Contrary to a marked accelerating effect of guanine-fraction, especially of guanylic acid, adenine-fraction had rather a slight inhibitory effect. At the same time, it was proved that nucleic acid and guanine-fraction, particularly guanylic acid, reacted directly with methylglyoxal whilst adenine- and pyrimidine-fraction were quite indifferent (Table XVI). The conspicuous affinity between guanylic acid and methylglyoxal may be due to the greater solubility of the acid in comparison to guanine. If the decrease of methylglyoxal be conceived of as involving a direct reaction between methylglyoxal and guanine, the difference in the effects of nucleic acid and its decomposition products can be easily explained. Then the slightly accelerating effect of nucleic acid must be attributed to the presence of guanine in its molecule. Thus the apparent co-enzyme-like action of nucleic acid and guanine-derivatives is in reality the

result of the direct chemical reaction of guanine with methylglyoxal.

Another interesting case of the interaction of methylglyoxal with biologically important compounds may be cited. When methylglyoxal was brought in contact with amino acids, rather a rapid disappearance of methylglyoxal was observed, coupled with the production of ammonia and carbon dioxide. The optimum hydrogen-ion concentration for this reaction lay round pH 7. Since it is revealed in Table XVII that one molecule of monoamino acids responded to one molecule of methylglyoxal and a molecule of diamino acids to two molecules of methylglyoxal, the conjecture may be hazarded that the point of attack of methylglyoxal might be the amino groups of the acids. An added emphasis must be given to the fact that the liberated quantity of both ammonia and  $\text{CO}_2$  came always to 70 to 80% of the values computed from the amounts of amino acids involved in the reaction. The endeavour to raise the yield of these products ended in failure. The chemical nature of this reaction is quite uncertain at present. Yet a type of desaminization is thus established. Neuberg (1927) has already touched this line and noticed the production of a scanty quantity of aldehydes or ketones of less carbon atoms than the amino acids. The natural proteins and peptone, too, reacted just in the same manner as the amino-acids (Table XVIII).

#### "ANTIGLYOXALASE."

Dakin and Dudley (1913) found so-called "antiglyoxalase" in the pancreas which exerted an inhibitory action on glyoxalase of other tissues. Foster and Woodrow (1924) and Foster (1925) noticed another pancreatic factor which prevented the lactic acid formation in the chopped muscle. They assumed from their rather unsatisfactory results that this pancreatic factor differed from "antiglyoxalase" in its solubility in 70% alcohol, in its thermostability and in its susceptibility to alkali. Ariyama (1928) could not verify Foster's suggestion that the pancreatic inhibitor

might act on the substrate (she used phenylglyoxal instead of methylglyoxal) rather than on glyoxalase itself.

Several experiments were carried out with the purpose of testing whether Foster's pancreatic factor would actually differ, as she assumed, from Dakin's "antiglyoxalase" or not. The dried beef pancreas powder and 70% alcoholic extract of its were prepared exactly according to the Foster and Woodrow method and the behaviour of the extract towards glyoxalase, heat and alkali was compared with that of "antiglyoxalase". Methylglyoxal was used exclusively as the substrate (not phenylglyoxal). The extract was completely free from trypsin. The inhibitory action of 70% alcoholic extract of the dried pancreas on glyoxalase was not so feeble as Foster had noticed. The harmful effect of the extract increased with the prolongation of time of the contact of the extract with glyoxalase before the addition of the substrate (Table XIX). At the start 13% inhibition was observed, after 5 hours' contact the inhibition becoming 55%. As was already observed by Foster and Woodrow, and Ariyama, "antiglyoxalase" was so resistant to heat that its enzyme nature was quite doubtful. The Foster extract and "antiglyoxalase" showed thermostability and alkali-susceptibility of the same degree, when their anti-action on glyoxalase was examined (Table XX and XXI). The loss of their inhibitory action was about 50% by heating at 100° for 20 minutes and 12-13% by treating with 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  for 24 hours at 37.5°. Both pancreatin itself and 70% alcoholic extract of it were used as "antiglyoxalase" in some experiments. The pancreatin extract showed a more distinct inhibitory action on glyoxalase than the Foster extract. So long as glyoxalase and methylglyoxal are concerned, the above findings are indicative, it may be interpreted, of the identity of Foster's pancreatic factor for chopped muscle and of "antiglyoxalase" for glyoxalase.

## Experimental.

### I. THE DETERMINATION OF METHYLGLYOXAL.

Ariyama's colorimetric method was used throughout the experiments. To 10 cc. of glyoxal solution to be examined, which had been deproteinized with 20% trichloroacetic acid if necessary, were added in order, 2 cc. of Benedict's arsenophosphotungstic acid followed by 1 cc. of  $m$  NaCN and 5 cc. of  $m$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . After standing 10 minutes, the mixture was diluted to 100 cc. with water and the depth of the blue color was read against a comparable standard in which 10 cc. of 0.001  $m$  methylglyoxal had been treated in the same way. When a dilute solution or 5 cc. of a solution was to be handled, the amount of added reagents was cut in half and the mixture was diluted to 50 cc.

The standardization of methylglyoxal was performed by either of the following two methods. The one is based upon the fact that one molecule of methylglyoxal, when treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  in strong alkaline solution, yields a molecule of acetic and formic acids; thus the quantity of methylglyoxal is deduced from the amount of acids produced. The other method is to determine the amount of potassium permanganate consumed when an excess of it is heated with methylglyoxal in strong alkaline solution.

### II. THE DISTRIBUTION OF GLYOXALAS IN ANIMAL AND PLANT WORLD.

#### A) *The distribution in the animal world.*

One gram of fresh tissues, which had been ground up with 3 gm. of clean sand, was mixed with 3 cc. of 0.1  $m$  neutralized methylglyoxal, diluted to 100 cc. with warm boric acid-borax buffer solution of pH 7.0 and incubated at  $37.5^\circ$ . The above operation was finished within 5 minutes after the death of the animals. After 20 minutes' incubation, 10 cc. of the solution were pipetted out, and to them were added 4 cc. of 10% trichloroacetic acid and 6 cc. of water, mixed thoroughly and filtered after 10 minutes' standing.

The decrease of methylglyoxal was determined in 5 cc. of the filtrate and the glyoxalase activity was calculated from the amount of decomposed methylglyoxal. The unit of the activity was provisionally taken as that of 1 gm. of the tissue which converts 20 mg. of methylglyoxal in 20 minutes under the conditions mentioned above.

The animals used were: dog, cat, rabbit, rat, mouse and guinea pig among mammals; fowl, pigeon and goose among avians; carp, trout and seaperch among fishes; frog and bull-frog among amphibians.

The results are as follows.

TABLE I.  
Relative Glyoxalase Contents of Normal Animal Tissues.

Class	Glyoxalase Unit					
	Liver	Muscle	Blood	Kidney	Spleen	Brain
Mammal	1.0	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4
Avian	1.0	0.3	0.3	0.6	0.3	
Fish	0.5	0.3	0.2			
Amphibian	0.5	0.3				
Hen's Egg	Yolk 0.12	White 0.05				

Glyoxalase was never found in the urine under any circumstances.

*B) The distribution of glyoxalase in animal tissues under abnormal conditions.*

The animals used were as follows.

- 1) Rabbits starved for 5 days.
- 2) Rabbits starved for 10 days.
- 3) Rabbits starved for 10 days and then made convulsive by the injection of 1 cc. 1:1000 strychnine per kg. body weight for

the purpose of reducing the sugar storage of the tissues to the minimum limit.

- 4) Rabbits with hypoglycemic convulsion caused by the injection of 5 units of "Sankyo" insulin per kg. body weight.
- 5) Rabbits kept hypoglycemic (blood sugar level=0.05—0.04%) by three successive injections of 1 unit of "Sankyo" insulin per kg. body weight every three hours.
- 6) Completely phlorhizinized rabbits by injecting 0.5 gm. phlorhizine daily for 3 days ( $D:N=\pm 3$ )
- 7) Rabbits with hyperglycemia (blood sugar=0.25—0.3%), caused by injecting 0.2 cc. 1:1000 adrenalin per kg. body weight daily for 4 days.
- 8) Phosphorous intoxicated rabbits by injection of 0.05 gm. yellow phosphorous per kg. Examined 36 hours after the injection.
- 9) Depancreatized dogs with severe glycosuria. Examined 3 days after the operation.

The experiments were run in the same way as in the case of normal animals. The results are summarised in Table II. These results are based at least on triplicate concordant tests.

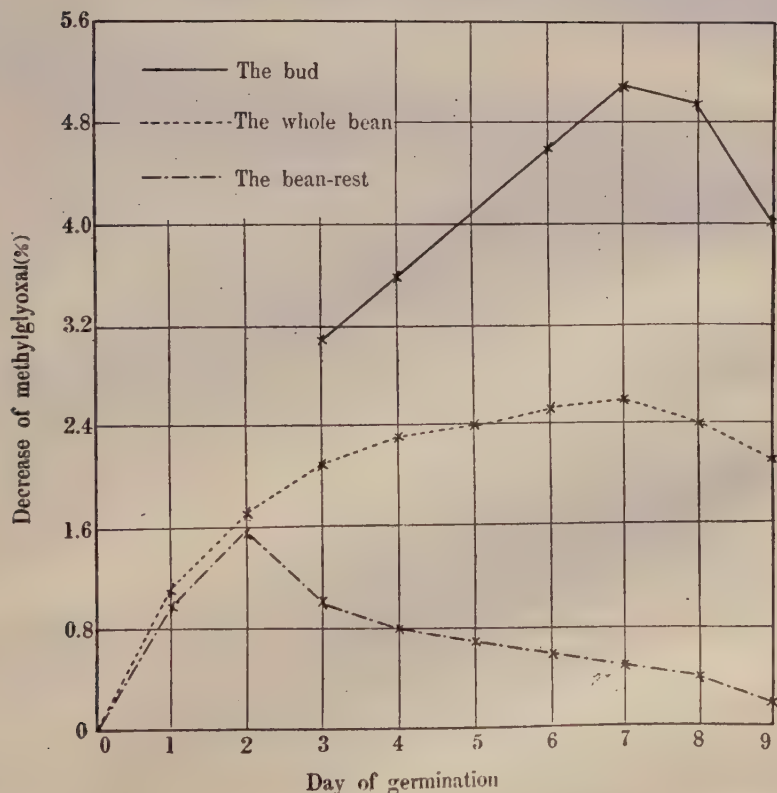
TABLE II.  
Relative Glyoxalase Contents of Animal Tissues under  
Abnormal Conditions.

Condition of animal	Relative glyoxalase activity (given in unit)					
	Liver	Muscle	Blood	Kidney	Spleen	Brain
Normal rabbit	1.0	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4
1)	1.0	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3
2)	0.7	0.15	0.1	0.1	0.1	0.2
3)	0.7	0.07	0.08	0.1	0.1	0.2
4)	1.0	0.2	0.15			
5)	1.0	0.3	0.16	0.3	0.3	0.4
6)	0.7	0.18	0.16	0.2	0.3	0.3
7)	0.8	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4
8)	0.7	0.1	0.06	0.06	0.04	0.2
9)	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4

*B) The distribution of glyoxalase in the plant world.*

Soy-beans were kept moistened at 25° and the glyoxalase contents of bud, bean-rest and whole bean were examined daily. For this purpose 1 gm. of the bean or the bud was ground up with sand and mixed with methylglyoxal and the buffer solution of pH 7.0 just in the same way as in the case of the animal tissues. After 20 minutes' incubation the remaining methylglyoxal was determined. (Chart I).

Chart I. Glyoxalase contents of soy-bean during germination.



### III. PREPARATION OF GLYOXALASE POWDER.

One part of the minced fresh rabbit's liver was stirred up with 4 parts of absolute alcohol for 5, 10, 20 and 30 minutes at room temperature, filtered quickly, treated with ether and dried in the desiccator. 0.14 gm. of the powder corresponded to one gram of the fresh tissue. One gram of the sample thus prepared was extracted with 35 cc. of pH 8.4, pH 7.0 and pH 6.2 buffer solutions, physiological NaCl solution and distilled water respectively for two hours at room temperature with occasional stirring and then filtered. To 5 cc. of the filtrate (=0.14 gm. powder or 1 gm. fresh liver) were added 3 cc. of 0.1 m methylglyoxal, made up to 100 cc. with pH 7.0 buffer solution and kept at 37.5°. After 20 minutes' incubation the mixtures were tested to determine the quantity of glyoxal remaining in them. The results are listed in Table III.

TABLE III

The Inhibitory Effect of Alcohol on Tissue Glyoxalase, and the Influence of pH of the Extracting Liquids on the Extraction of Glyoxalase from the Powder. The Enzyme Activity is Given by the Decrease (%) of Methylglyoxal.

Duration of alcohol-treatment	Decrease of methylglyoxal				
	pH of the extracting liquid			Physiological NaCl solution	Aq. dest.
	pH 8.4	pH 7.0	pH 6.2		
min.	%	%	%	%	%
5	42.9	45.2	40.0	43.8	41.4
10	40.0	42.9	37.1	41.4	38.6
20	37.1	41.9	34.3	38.6	35.7
30	34.3	38.6	31.4	35.7	33.3

With the object of establishing the relation between the extracting duration and the temperature, the powder, which had been treated with alcohol for 5 minutes, was extracted at 20° and 37.5°

with pH 7.0 buffer solution in the manner stated above for suitable periods. The results are as follows.

TABLE IV.

The Optimum Duration of the Extraction of the Powder at 20° and 37°. The Enzyme Activity is Given by the Decrease (%) of Methylglyoxal.

Duration of extraction	Decrease of methylglyoxal	
	at 20°	at 37.5°
hr.	%	%
1	34.3	45.2
2	45.2	43.3
3	41.4	41.4
4	34.3	
24	20.0	

#### IV. CO-ENZYME FOR GLYOXALASE.

##### A) *Existence of co-enzyme.*

The co-enzyme solutions were prepared in the following way. The 10% watery suspensions of hashed fresh liver, muscle and kidney of the rabbit were boiled for 5 and 20 minutes respectively and filtered. 10 cc. glyoxalase solution (fresh liver and muscle) + 5 cc. co-enzyme solution + 3 cc. 0.1 m methylglyoxal. Made up to 100 cc. with pH 7.0 buffer solution. After 20 minutes' incubation 37.5°, the remaining methylglyxal was determined. The controls were run without co-enzyme. The results are tabulated in Table V.

The next experiment was to ascertain the relation between the amount of co-enzyme and its activity. 5 cc. glyoxalase solution + 0, 3, 5 and 10 cc. of boiled liver juice (10%, 10 minutes). 20 minutes' incubation. The decrease of methylglyoxal was 54, 69, 78 and 98% respectively.

TABLE V.  
The Co-enzyme Contents of Rabbit's Tissues.

Source of glyoxalase	Co-enzyme		Decrease of methylglyoxal	Rate of acceleration of glyoxalase by the addition of co-ferment	Rate of co-enzyme contents of the tissues
	Source	Time of boiling			
Liver	Control (without co-enzyme)		% 44.5	% —	—
	Liver	min. 5	52.5	17.8	1.0
	Muscle	"	47.5	6.5	0.3
	Kidney	"	45.4	1.8	0.1
	Liver	20	69.5	55.8	1.0
	Muscle	"	52.3	17.7	0.3
	Kidney	"	47.4	5.8	0.1
Muscle	Control (without co-enzyme)		9.8	—	—
	Liver	5	17.0	73.3	1.0
	Muscle	"	12.1	23.8	0.3
	Kidney	"	10.5	7.1	0.1

### B) Dialysis of glyoxalase.

Three portions of 20 cc. of 20% watery extract of liver (glyoxalase) were kept in collodion sacks and dialysed against 3000 cc. of distilled water for 1, 3 and 5 hours. The contents of each sack were divided into 6 equal parts to carry out the following experiments.

The co-enzyme solution used was prepared by boiling 10% liver suspension for 20 minutes. Blanks were run with the non-dialysed extract which was kept otherwise under the same conditions as the dialysed, that is, it was kept at the same temperature as in the main tests for 1, 3 and 5 hours and water was added to it by an amount

equivalent to the quantity of water diffused into the sacks in the corresponding main tests.

I)	5 cc. dialysed liver extract	+	0	+	3 cc. 0.1 m methylglyoxal
II)	"	+ 0.5 cc. boiled juice	+	"	"
III)	"	+ 1.0 cc.	"	+	"
IV)	"	+ 3.0 cc.	"	+	"
V)	"	+ 5.0 cc.	"	+	"
VI)	"	+ 10.0 cc.	"	+	"
VII)	5 cc. non-dialysed liver extract	+ 0	+	"	"

The mixtures were diluted to 100 cc. with pH 7.0 buffer solution. After 20 minutes' incubation at 37.5°, the decrease of methylglyoxal was examined.

TABLE VI.

The Dialysis of Glyoxalase and the Recovery of Its Activity by the Addition of Co-enzyme.

Time of dialysis of glyoxalase	Decrease of methylglyoxal						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
hr.	%	%	%	%	%	%	%
1	25.7	29.5	38.6	61.4	87.0	100	79.5
2	10.0	15.2	21.0	42.4	—	—	60.0
5	0	11.4	17.1	32.4	—	—	31.0

*C) The effect of co-enzyme on soy-bean glyoxalase.*

The glyoxalase activity of soy-beans which were kept moistened at 25° was examined daily with and without the addition of sufficient quantity of co-enzyme. 20% extract of 5 gm. of soy-beans + 5 cc. boiled liver juice (20%, 10 min.) + 3 cc. 0.1 m methylglyoxal. Diluted to 100 cc. with pH 7.0 buffer solution. The decrease of methylglyoxal was determined after an hour's incubation at 37.5°.

TABLE VII.  
The Effect of Co-enzyme on Soy-bean Glyoxalase.

Day of germination	Decrease of methylglyoxal	
	Without co-enzyme	With co-enzyme
1.	% 17.0	% 50.7
2.	21.2	53.0
3.	24.3	51.4
4.	26.1	50.9
5.	28.2	49.8
6.	30.0	52.3
7.	30.2	52.4
8.	32.7	50.8
9.	30.9	49.9
10.	27.2	50.7

*D) The influence of starvation on glyoxalase and co-enzyme content of the rabbit's liver.*

The rabbit was starved for 10 days. The co-enzyme solutions were prepared by boiling 20% watery liver extracts of normal and starved rabbits for five minutes.

To 5 cc. of fresh glyoxalase solutions prepared from the normal and starved livers were added various quantities of the co-enzyme samples and 3 cc. of 0.1 m methylglyoxal and made up to 100 cc. with pH 7 buffer solution. After 20 minutes' incubation at 37.5° the decrease of methylglyoxal was tested. The data are tabulated in the following table.

TABLE VIII.

The Co-enzyme Contents of the Livers of Normal and Starved Rabbits.

Glyoxalase		Co-enzyme		Decrease of methylglyoxal	Acceleration by co-enzyme added
Amount used	Condition of liver	Amount added	Condition of liver		
cc. 5	Normal	cc. 0	—	% 44.4	% —
"	"	5	Starved	53.7	20.9
"	"	10	"	68.3	53.8
"	"	2	Normal	66.8	50.5
"	"	5	"	80.5	81.3
"	"	10	"	100	125.2
"	Starved	0	—	3.88	—
"	"	2	Normal	37.3	856
"	"	5	"	63.6	1532
"	"	10	"	88.8	2177

## V. CO-ENZYME-LIKE SUBSTANCES.

A) *The effect of glucose on the dialyzed glyoxalase.*

5 cc. dialysed glyoxalase (5 hrs.) + 3 cc. 0.1 m. methylglyoxal + 1, 3 and 5 gm. glucose. Diluted to 100 cc. with pH 7.0 buffer solution. Incubated at 37.5° for 20 minutes.

TABLE IX.

The Recovery of the Activity of Dialysed Glyoxalase by the Addition of Glucose.

Amount of glucose added	Decrease of methylglyoxal	Recovery of glyoxalase activity
gm. 0	% 0	% —
1	8.2	14.4
3	13.4	23.5
5	17.6	30.9
Control (Non-dialysed glyoxalase, no glycose)	57.0	—

*B) The accelerating effect of glucose on fresh glyoxalase.*

4 cc. glyoxalase solution + 3 cc. 0.1 m methylglyoxal + varying amounts of glucose. 20 minutes' incubation at 37.5°.

TABLE X.

Co-enzyme-like Effect of Glucose on Fresh Glyoxalase.

Concentration of glucose	Decrease of methylglyoxal	Acceleration
%	%	%
0	43.6	—
0.0001	43.6	0
0.0005	44.0	+0.9
0.005	47.7	9.4
0.05	56.3	29.1
0.1	62.2	42.6
0.2	67.7	55.3
0.3	63.6	45.9
0.4	62.2	42.6
0.5	57.2	31.2

*C) The effect of various sugars on glyoxalase activity.*

5 cc. glyoxalase solution + 3 cc. 0.1 m. methylglyoxal + varying quantities of various sugars. 20 minutes' incubation at 37.5°. The results are summarized in table XI.

*D) The effect of aldehydes, ketones and lactic acid on glyoxalase.*

5 cc. glyoxalase solution + 3 cc. 0.1 m methylglyoxal + aldehydes etc. 20 minutes' incubation. The results are shown in Table XII.

TABLE XI.  
The Effect of Various Sugars on Glyoxalase.

	Amount of sugars								
	0	0.005%		0.05%		0.2%		5.0%	
	Decrease of methylglyoxal	Decrease of methylglyoxal	Acceleration	Decrease of methylglyoxal	Acceleration	Decrease of methylglyoxal	Acceleration	Decrease of methylglyoxal	Acceleration
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Glucose	48.6	50.9	5	57.4	18	69.0	42	57.4	20
Fructose	"	48.6	0	48.6	0	48.3	0	48.6	0
Mannose	"	48.6	0	48.6	0	48.6	0	48.6	0
Galactose	"	48.6	0	48.6	0	48.6	0	48.6	0
Sucrose	"	49.0	1	60.6	25	58.8	21	53.7	10
Maltose	"	48.6	0	62.9	29	62.0	27	52.7	9
Lactose	"	48.6	0	64.8	33	59.7	23	58.3	20
Glycogen	"	48.6	0	57.4	18	64.8	33	55.6	14
Arabinose	"	48.6	0	50.0	3	55.5	14	60.6	25
Xylose	"	48.6	0	55.6	14	52.8	9	48.6	0

TABLE XII.  
Effect of Aldehydes and Other Substances on Glyoxalase.

Concentration, of substances	Control	Form-aldehyde		Acet-aldehyde		Lactic acid		Acetone		Dihydroxy-acetone	
	Decrease of methylglyoxal	Decrease of methylglyoxal	Effect	Decrease of methylglyoxal	Effect	Decrease of methylglyoxal	Effect	Decrease of methylglyoxal	Effect	Decrease of methylglyoxal	Effect
m	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0	55.6	55.6	0	55.6	0	55.6	0	55.6	0	55.6	0
0.0005		55.6	0	55.6	0	55.6	0	55.6	0	55.6	0
0.001		52.8	-5.0	53.4	-3.9	53.5	-3.8	56.5	+1.6	58.3	+4.8
0.01		51.7	-7.0	47.3	-14.9	52.7	-5.2	56.7	+1.9	61.1	+9.9
0.05								58.3	+4.8	64.8	+16.6
0.1								56.5	+1.6	57.5	+3.4

The effect is expressed in percent acceleration (+) or inhibition (-) in comparison with the control.

*E) The effect of phosphate on glyoxalase activity.*

4 cc. glyoxalase solution + 3 cc. 0.1 m methylglyoxal + varying amounts of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Diluted to 100 cc. with pH 7 buffer solution. 20 minutes' incubation.

TABLE XIII.  
The Effect of Phosphate on Glyoxalase Activity.

Amount of $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Decrease of methylglyoxal	Inhibition
gm.	%	%
0	60.3	—
0.05	60.3	0
0.1	57.2	- 5.0
0.2	53.4	-11.4
0.5	49.1	-18.6

The presence of several percent of phosphate did not interfere with the color production of methylglyoxal. Sometimes, especially when excess of the color reagents was used in the presence of phosphate, there occurred white precipitate, which could be, however, filtered off without any loss of the depth of the color. To ascertain the directly harmful effect of phosphate on glyoxalase the following experiment was performed: 4 portions of 4 cc. of glyoxalase solution were incubated at  $37.5^\circ$  with 50 cc. of pH 7.0 borax-boric acid buffer, which contained 0.2%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , for 0, 10, 30 and 60 minutes respectively, then added with 3 cc. of 0.1 m methylglyoxal, diluted up to 100 cc. with pH 7.0 buffer (without phosphate), incubated for 20 minutes further and the decrease of methylglyoxal were examined. A control was run without adding phosphate. (Table XIV).

*F) The effect of nucleic acid and its decomposition products on dialysed glyoxalase, and their direct reaction with methylglyoxal.*

60 cc. of fresh glyoxalase solution were dialysed against distilled water through collodion membrane. After 2 hours' dialysis

TABLE XIV.

The Effect of the Time of Contact of Glyoxalase with Phosphate on Its Activity.

Time of incubation of glyoxalase with phosphate	Decrease of methylglyoxal	Inhibition
min.	%	%
0	45.1	- 4.5
10	43.9	- 7.0
30	41.7	-11.9
60	32.9	-30.3
control	47.2	—

the contents of the collodion sack were divided into 12 portions. To each portion were added 3 cc. of 0.1 m methylglyoxal and the substances to be examined. Diluted to 100 cc. with pH 7 buffer solution. Incubated at 37.5° for 20 minutes.

TABLE XV.

The Effect of Nucleic Acid and its Decomposition Products on Dialysed Glyoxalase.

Substance examined		Decrease of methylglyoxal	Acceleration(+) or inhibition(-)
Name	Amount added		
—	gm. —	% 19.1	% —
Na-nucleinate	0.05	20.0	+5
	0.1	20.9	+9
Guanylic acid	0.05	39.3	+106
	0.1	67.7	+255
*Guanine	0.05	21.0	+10
	0.1	31.5	+65
Adenosine	0.05	19.0	0
	0.1	17.0	-11
*Adenine	0.05	18.7	-2
	0.1	16.0	-16

\* The mixture containing sparingly soluble guanine or adenine was shaken continuously throughout the incubation.

The direct reaction between methylglyoxal and nucleic acid and its decomposition products was examined in the following manner.

6 cc. 0.1 m methylglyoxal + substances to be tested. Diluted to 100 cc. with distilled water. Incubated at 37.5°.

TABLE XVI.

The Reaction Between Methylglyoxal and Nucleic Acid and Its Decomposition Products.

Substance examined		Decrease of methylglyoxal		
Name	Amount added	Time of incubation		
		10 min.	30 min.	60 min.
Na-nucleinate	gm. 1.0	% 6.8	% 12.8	% 19.5
	0.3	9.5	15.6	26.6
Guanylic acid	0.1	35.1	53.0	59.8
	0.3	67.9	93.7	100
Guanosine	0.1	30.5	47.9	60.1
*Guanine	0.1	16.5	26.3	32.1
	0.3	19.3	29.5	42.6
Adenosine	0.1	0	0	0
	0.3	0	0	0
*Adenine	0.1	0	0	0
	0.3	0	0	0
Uridine	0.1	0	0	0
	0.3	0	0	0

\* The mixtures were shaken throughout the incubation.

TABLE XVII.  
Interaction of Methylglyoxal with Amino Acids.

Amino acids	Time of interaction	Decrease of methylglyoxal		Decrease of Amino acids		Molecular ratio between methylglyoxal and amino acids decreased	Production of NH <sub>3</sub>		Production of CO <sub>2</sub>	
		mg.	%	mg.	%		mg.	%	mg.	%
Glycine	hr.									
	1	7.2	16.7	7.5	1.5	1 : 1.00	1.3	76.0	—	—
	3	15.5	35.9	17.0	3.4	1 : 1.08	2.8	72.7	—	—
	5	20.1	42.3	22.0	4.4	1 : 1.05	3.6	72.3	—	—
	8	24.6	56.9	28.0	5.6	1 : 0.97	4.3	67.7	—	—
Alanine	1	6.8	15.7	7.5	1.5	1 : 0.89	1.1	76.9	8.6	65.0
	3	17.7	41.0	22.1	4.4	1 : 1.09	3.3	78.2	8.8	71.2
	5	28.5	56.0	35.6	7.1	1 : 1.00	5.4	79.4	13.8	71.8
	8	30.2	69.9	37.7	7.5	1 : 1.00	5.6	77.7	13.8	61.5
Glutamic acid	1	7.2	16.7	14.7	2.9	1 : 1.00	1.3	76.5	6.7	69.8
	3	17.9	41.4	36.5	7.3	1 : 1.00	3.0	71.1	15.9	66.8
	5	23.1	53.5	47.1	9.4	1 : 1.00	4.0	73.5	21.3	68.4
	8	27.4	63.4	55.9	11.2	1 : 1.00	4.7	73.4	23.7	65.0
Cystine	1	5.0	11.6	8.3	1.7	1 : 0.50	0.9	76.9	2.2	15.5
	3	17.8	41.2	29.6	5.9	1 : 0.50	2.9	69.2	7.7	66.0
	5	27.4	63.4	45.2	9.0	1 : 0.50	4.9	76.5	11.2	63.6
	8	32.1	75.5	54.2	10.8	1 : 0.50	6.1	79.5	13.8	63.9

G) *Interaction of methylglyoxal on amino acids.*

6.0 cc. 0.1 m methylglyoxal + 0.5 gm. amino acids. Diluted to 100 cc. with pH 7 buffer solution. Decrease of methylglyoxal and amino acids (van Slyke) and increase of  $\text{NH}_3$  (van Slyke and Cullen) and  $\text{CO}_2$  (aeration) were determined at intervals at room temperature. (Table XVII).

Serum-alumine, edestine and peptone were treated in the same way as in the above experiment. (Table XVIII).

TABLE XVIII.  
Reaction between Methylglyoxal and Proteins.

	Time of interaction	Decrease of methylglyoxal		Production of $\text{NH}_3$
		mg.	%	
Serum-albumine	hr. 0.5	3.7	8.6	—
	1	9.1	20.8	0.76
	2	10.6	24.5	—
	3	13.5	31.3	1.26
	5	16.3	37.3	1.52
Edestine	0.5	5.2	12.0	
	1	9.1	21.1	
	2	10.6	24.5	
Peptone	0.5	3.9	9.1	
	1	8.3	19.2	
	2	10.2	23.5	

## VI. "ANTIGLYOXALASE."

For the preparation of dried pancreas powder and its alcoholic extract Foster and Woodrow's paper (1924) must be referred to.

A) *The effect of Foster's extract and "antiglyoxalase" on the glyoxalase.*

The mixture of 20 cc. of 20% extract of rabbit's liver and 20 cc. of 20% extract of fresh pancreas ("antiglyoxalase") or 10 cc. of the Foster extract (=1 gm. pancreatic powder) was diluted to 100 cc. with pH 7.0 buffer solution and kept at 37.5°. At intervals, 20 cc. of the mixture were pipetted out, added with 4 cc. of 0.1 m methylglyoxal, made up to 100 cc. with pH 7.0 buffer solution and the decrease of methylglyoxal was determined after 20 minutes' incubation at 37.5°. (Table XIX).

TABLE XIX.

Effect of "Antiglyoxalase" and of Foster's Extract on Glyoxalase.

Time of contact (glyoxalase + anti-factor)	Decrease of methylglyoxal			Inhibition	
	Control (without anti-factor)	"Anti- glyoxalase"	Foster's extract	"Anti- glyoxalase"	Foster's extract
hr.	%	%	%	%	%
0	95.6	79.2	83.7	17.2	13.0
1	88.5	63.7	65.1	22.4	26.4
3	42.9	28.9	25.1	30.4	41.4
5	20.5	10.4	9.5	49.2	54.7

B) *Thermostability of "antiglyoxalase" and Foster's extract.*

- I) 4 cc. glyoxalase + 4 cc. H<sub>2</sub>O. + 4 cc. 0.1 m methylglyoxal.  
 II) " + 4 cc. "antiglyoxalase" + " "  
       (fresh pancreas extract)  
 III) " + 4 cc. " + "  
       (heated at 100° for 20 min.)  
 IV) " + 2.0 cc. Foster extract + "  
       (= 0.2 g. pancreas powder)  
 V) " + 2.0 cc. " + "  
       (heated at 100° for 20 min.)

Each mixture was diluted to 100 cc. with pH 7.0 buffer solution.

The decrease of methylglyoxal was determined after an hour's incubation at 37.5°. (Table XX).

TABLE XX.  
Thermostability of "Antiglyoxalase" and Foster's Extract.

	Decrease of methylglyoxal	Inhibition	Destruction by heat
	%	%	%
I	84.3		
II	66.0	21.8	} 54.1
III	75.9	10.0	
IV	67.0	20.5	} 53.7
V	76.4	9.4	

C) Alkali-stability of "antiglyoxalase" and Foster's extract.

70% alcoholic extract of pancreatin ("antiglyoxalase") was prepared exactly in the same way as the Foster extract. In experiments III and V 2 cc. of the Foster and pancreatin extracts were incubated with 2 cc. of 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution at 37.5° for 24 hours before the addition of glyoxalase. These samples were thus "alkali-treated".

- I) 5 cc. glyoxalase + 2 cc.  $\text{H}_2\text{O}$ .
- II) 5 cc. " + 1 cc. Foster's extract + 1 cc.  $\text{H}_2\text{O}$ .
- III) 5 cc. " + 2 cc. " (alkali-treated) + 0 cc. "
- IV) 5 cc. " + 1 cc. pancreatin extract + 1 cc. "
- V) 5 cc. " + 2 cc. " (alkali-treated) + 0 cc. "

To each mixture were added 3 cc. of 0.1 m methylglyoxal, diluted to 100 cc. with pH 7.0 buffer solution and the decrease of methylglyoxal was determined after 20 minutes' incubation at 37.5°.

TABLE XXI.

Alkali-stability of "Antiglyoxalase" and Foster's Extract.

	Decrease of methylglyoxal	Inhibition	Destruction by alkali-treatment
I	% 44.8	% —	% —
II	14.4	67.9	} 12.7
III	18.2	59.3	
IV	8.9	80.1	} 12.6
V	13.1	70.8	

## SUMMARY.

1. The distribution of glyoxalase in animal tissues was examined. Generally speaking, the glyoxalase content was highest in the liver, the other tissues containing 30–60% of that of the liver. There was no noticeable fluctuation in the glyoxalase distribution in the tissues, so long as the animal was kept under normal conditions. The main difference between warm- and cold-blooded animals was that the liver of the latter was 50% inferior to that of the former in its glyoxalase content.

2. The glyoxalase contents of the animal tissues decreased definitely when the tissues were subjected to continuous deprivation of sugar. The liver lost the enzyme most slowly in comparison with other tissues.

3. The relation between the glyoxalase content and the process of germination of the soy-bean was studied. Glyoxalase of the bud increased rapidly up to the 7th or 8th day of germination, and was succeeded by a subsequent declination. This increase in glyoxalase may be attributed to the increase of co-enzyme rather than to that of the enzyme itself.

4. The dry glyoxalase sample was prepared by the successive treatment of animal tissues with alcohol and ether. The powder retained 70% activity of the original fresh tissue and could be kept

for at least four weeks without loss of its power. The extraction of the enzyme from the powder was achieved most effectively by shaking it with a neutral liquid for two hours at room temperature or for an hour at 37°.

5. When glyoxalase was dialysed through collodion membrane against distilled water, its activity disappeared after 5 hours. The lost activity was restored definitely by the addition of boiled tissue juice.

6. Glucose and polysaccharides, which contain glucose in the molecules, accelerated the activity of dialysed and non-dialysed glyoxalase. The hexoses other than glucose were quite indifferent to the enzyme. Inorganic phosphate inhibited the glyoxalase action. Guanine and its derivatives reacted directly with methylglyoxal. When methylglyoxal was brought into contact with amino acids, rather a rapid disappearance of methylglyoxal was observed, coupled with the production of  $\text{NH}_3$  and  $\text{CO}_2$ . The amount of liberated  $\text{NH}_3$  and  $\text{CO}_2$  was 70–80% of the value computed from the quantity of amino acids involved in the reaction.

7. Foster's pancreatic powder which, according to her statement, inhibits the lactic acid formation in chopped muscle and differs from "antiglyoxalase" in some respects, seems to be identical with "antiglyoxalase" in every point.

#### REFERENCES.

- Ariyama, N. (1928): *J. Biol. Chem.*, **77**, 359.  
Ariyama, N. (1928): *J. Biol. Chem.*, **77**, 395.  
Dakin, H. D. and Dudley, H. W. (1913): *J. Biol. Chem.*, **14**, 155; 423.  
Dudley, H. W. (1926): *Biochem. J.*, **20**, 314.  
Euler, H. and Myrbäck, C. (1929): *Z. Physiol. Chem.*, **184**, 163; *Naturwissenschaft*, **17**, 291.  
Fischer, H. O. L. and Feldmann, L. (1929): *Ber. Chem. Ges.*, **62**, 864.  
Fischer, H. O. L. and Taube, C. (1924): *Ber. Chem. Ges.*, **57**, 1502.  
Foster, D. L. (1925): *Biochem. J.*, **19**, 757.  
Foster, D. L. and Woodrow C. E. (1924): *Biochem. J.*, **18**, 562.  
Kuhn, R. and Heckscher, R. (1926): *Z. Physiol. Chem.*, **160**, 116.  
Neuberg, C. (1913): *Biochem. Z.*, **49**, 502; **51**, 484.

- Neuberg, C. and Gorr, G. (1925): *Biochem. Z.*, **162**, 490; **166**, 482.  
Neuberg, C. and Kobel, M. (1929): *Biochem. Z.*, **207**, 232.  
Neuberg, C. and Kobel, M. (1929): *Biochem. Z.*, **210**, 466.  
Neuberg, C. and Kobel, M. (1927): *Biochem. Z.*, **185**, 477; **188**, 197.  
Neuberg, C. and Simon, E. (1927): *Biochem. Z.*, **186**, 331.  
Toeuniessen, E. and Fischer, W. (1926): *Z. physiol. Chem.*, **161**, 254.  
Vogt, M. (1929): *Biochem. Z.*, **211**, 17.  
Warburg, O. (1924): *Biochem. Z.*, **152**, 316.  
Zaleski, W. and Schatalowa-Zaleski, E. (1928): *Biochem. Z.*, **201**,  
190.



## ON THE BEHAVIOUR OF BLOOD WATER DURING ASPHYXIA.

By

TAKESHI SASO.

(From the Department of Forensic Medicine, Hokkaido Imperial University.  
Director: Prof. K. Yamakami.)

(Received for publication, Aug. 2, 1930.)

### INTRODUCTION.

It has long been known that in acute as well as in progressive asphyxia, many organic and inorganic constituents of the blood increase in amount. The asphyxial hyper-glycemia(1), the asphyxial hyper-chloremia(2) and the asphyxial hypercalcemia(2) etc. are especially well known. Beside these we can cite as inorganic substances which increase during asphyxia in the blood iron, phosphorus, magnesium, potassium, sodium etc., and as organic substances adrenalin, hemoglobin, organic phosphate, creatinine. The cellular elements such as red cells(4) and white cells(5) increase also in number. Though the increase of these blood constituents by asphyxiation is experimentally recognized as an undoubted fact by many investigators, the mechanism

---

(1) Starkenstein, E. (1911): Zeitschr. f. exper. Pathiol. u. Therap., **10**, 78; Pollak (1909): Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm., **61**, 378; Czubalski (1913): Centralbl. f. Physiol. **27**, 580; Bang u. Stenström (1913): Biochem. Zeitschr., **50**, 437; Menten (1927): Jour. of Biol. Chem., **72**, 249; Araki, T. (1891): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **15**, 366. (2) Yamakami, K. (1922): Tohoku Journal of exp. Med. **3**; Kubo, T. and Mitsui, T. (1928): Japan Medical World., **8**. (3) Kubo, T. (1927): Hokkaido Igaku Zasshi, **3**, 415; Saso, T. (1929): Hokkaido Igaku Zasshi, **11**, 1683. (4) Izquierdo (1928): Americ. Journ. of Physiol., **86**, 143; Binet and Cardat (1926): Arch. Intern. Physiol., **27**, 138. (5) Hochstetter (1910): Vierteljahrsschrift f. Ger. M., **40**, 272; Ishikawa (1881): Kokka Igaku Zasshi, 335.

of this phenomenon is not yet clearly elucidated. Many authors(6) attribute the asphyxial hyper-glycemia to the result of hyper-secretion of adrenalin due to asphyxial stimulation. Binet and Leon (1928) have observed the increase of iron content in the asphyxial blood, and explained it in the following way. In asphyxia, the spleen tissue is destroyed and the waste matter which contains much iron is introduced into the blood stream, resulting in the enhancement of percentage of iron in blood. Rittmann(1927) has attributed the asphyxial hyper-calcemia to the acidosis accompanied by asphyxia. K. Yamakami (1922) stated that the asphyxial hyper-chloremia very likely results from the asphyxial stimulation of the salt centre. On the other hand, however, the condensation of blood due to dehydration is taken as an essential factor by many authors. Collip (1927) has observed the hyper-calcemia and the increase of blood phosphate in the heart blood of asphyxiated fetal calves. According to him, asphyxia causes a definite decrease in the blood pH as well as in the volume of plasma. The plasma gives fluid to the tissues and to the red cells, since both the value of hemoglobin and of hematocrit are as a rule raised after asphyxia, and the concentration of the blood is sufficient to account for the increase in the amount of serum calcium and of inorganic phosphate. The change in the value of blood pH would also tend to cause an increase in the amount of organic phosphorus at the expense of the acid soluble fraction. Hall (1926) has concluded from the results of his investigation on the progressive asphyxia that the asphyxiation brings about an increased concentration of many of the blood constituents. With the exception of chlorides and sugars the increase in the concentration of blood is apparently gradual, and reaches its highest concentration just before the death of the animals experimented on (fishes). This fact indicates that the rise of percentage of various blood con-

---

(6) Starkenstein (1919): *Zeitschr. f. exp. Path. u. Thera.*, **10**, 78; Yamakami (1919): *Americ. Jour. of Physiol.*, **50**; Bang u. Stenström, Th. (1913): *Biochem. Zeitschr.*, **50**, 437.

stituents is caused mainly by the release of water from the blood and does not indicate an actual increase in the amount of them. In other words, the blood apparently becomes more concentrated by the reduction in blood volume, which may become reduced to nearly one half of the normal. He opines further that tissues very likely become acid during asphyxia, inducing the absorption of blood water into the tissues and the edema. The longer and the more profound the asphyxiation, the more water would be absorbed and the more concentrated the blood would become. From our institute M. Yoshida has formerly published the results of his investigation on the physico-chemical change of blood in the acute as well as in the progressive asphyxia. He states that the plasma albumen always becomes concentrated in the acute asphyxia (average 1,3%), while in the progressive asphyxia the change is indistinct and does not surpass the normal daily variation. He further states that the release of water from blood into tissues takes place in the same degree in both acute and progressive cases, while a definite difference can be found in respect to the variation in the blood albumen between both sorts of asphyxia. As stated above, the cause of the increase in various blood constituents may not be single, but various causes (hypersecretion, hormonal influence, acidosis or dehydration in blood) may cooperate in increasing the blood constituents, but whatever the cause may be, the mechanism may be classed as two kinds. The one is an actual increase in blood constituents through the emigration of dissolved substances or of cellular elements into the blood stream from the tissues, and the other is an apparent increase in the percentage of blood constituents due to the dehydration of blood. Though many authors insist on the release of water from blood into tissues during asphyxiation, yet they have not sufficient experiments to support their theory. The reduction of plasma or blood volume during asphyxiation is very conceivable, but it is not more than a hypothesis at present. If the increase in blood constituents results from the release of water from blood, their amount in the

plasma would be augmented first, and accordingly the increase in the percentage of various blood constituents would become higher in the plasma than in the whole blood. On the contrary, however, I have observed the reverse facts in the course of my investigation. Namely, in the progressive asphyxia several blood constituents increase in amount in the whole blood more than in the plasma. Under these circumstances I thought it very important to determine, to what extent the dehydration and the condensation of blood take place during asphyxia, and what degree of enhancement in the percentage of blood constituents can be taken as the result of condensation of blood. The present paper deals with the results of my experiments made for these purposes.

#### EXPERIMENT I.

In the first experiment, I have determined whether and to what extent the volume of plasma will be diminished during asphyxia. The total volume of plasma must be remarkably decreased during asphyxia, if an appreciable dehydration of blood and plasma takes place and the increase in the amount of various blood constituents are due solely to the condensation of blood. For the determination of plasma-volume the vital-red method originated by Keith and Rountree (1915) was applied. According to their experimental results on men the vital-red is a non-toxic and quite slowly absorbable dye, which remains nearly unabsorbed in the circulating plasma long enough for intermingling thoroughly with the blood plasma, that requires about 3 minutes. In order to investigate the rate of disappearance of injected dye from blood stream, these authors made scale-reading at 3 and 6 minutes after the dye had been injected, and obtained the following results; that is, in a series of 36 cases, 9 cases showed the same reading for the two determinations, 9 cases showed a higher reading for the second determination; while 16 cases showed a higher reading for the first determination. They have concluded from these results that some amount of dye disappears from the

circulation during the determination, but the loss of dye is inconstant and small. Their experiments on dogs, however, have given no such constant results as in the case with men, and they have explained this fact in the way that the volume of dog-plasma is subjected to relatively greater and more sudden changes than that of men. Lamson and Nagayama (1920) mentioned that the method for determination of plasma-volume based on the injection into the blood stream of stains such as vital-red, which diffuse very slowly and are carried only by plasma, is a nearly perfect method to determine the plasma-volume at present although there is no means of knowing the initial loss of dye, which would occur by the time the injected dye has perfectly intermingled with the circulating plasma. Be the absorption of vital-red very slow, as it may, yet it disappears anyhow from the blood stream with the lapse of time. I have, therefore, first determined in my preliminary experiment the rate of disappearance of injected vital-red.

As experimental animals rabbits were employed. The determination was made twice on each animal, that is, the first determination at 3,5-4 minutes, and the second at 7,5-8 minutes after the injection of dye. As the length of time-interval between the first and second determination, 4 minutes were chosen, because it corresponds to the length of time which is generally required for producing death of rabbits by acute asphyxiation, (rabbits generally die from acute asphyxia in 3,5-45 minutes). In these experiments, the solution of dye was injected into the auricular vein and the blood samples were always obtained from the right ventricle by heart puncture. According to my observation, there is some difference in the concentration of dye in the plasma between the left and right ventricle, the concentration in the plasma obtained from the right ventricle being slightly lower than that obtained from the left ventricle. Terry and Seib (1927) have demonstrated that the specific gravity of carotis blood is higher than that of blood withdrawn from the right ventricle,

and they attributed it to the extraction of water from blood on passing through the lungs. The difference in the concentration of dye between the blood samples collected from the right and left ventricle is probably due to the evaporation of blood water during the pulmonary circulation similar to that in the specific gravity. Various cautions written by Keith and Rowntree were strictly followed in determining the plasma-volume. The result is shown in Table I.

Lamson and Nagayama declare that the loss of dye injected is probably very slight, because the curve of disappearance of dye is nearly a horizontal line in the first few minutes after the injection of dye, and if one interpolates backward over the time taken for mixing, the lost amount of dye can be very slight, unless the initial loss is of an entirely different nature from the later disappearance from the blood stream.

On careful consideration, if the heart beat, the condition of vaso motor and the excretion continue unchanged to the moment of the second withdrawal of blood, in other words, if the dye injected into blood stream is merely absorbed or excreted without being influenced by some special causes, the second determination should show more or less lower concentration of dye than the first determination, and the value obtained for the total plasma in the second determination should be always greater than in the first. If, therefore, a higher value for the concentration of dye resp. a smaller value for the total volume of plasma is obtained in the second determination, it must imply some technical errors. According to the experimental results with dogs and rabbits presented by Lamson and Nagayama, however, in one case no notable difference was found in the density of dye, and in the majority of cases the first determination showed a higher reading, namely in the cases of dogs 10-17 cc., and in the experiments on rabbits, 1-4 cc. of plasma decreased within 20 to 60 minutes after injection of dye. Similar results were found in some cases of experiments made on men by Keith and Rowntree. These results are un-

reasonable and must be due to some technical errors, provided the injection of dye itself does not cause any change in the volume of plasma.

TABLE I.

Rabbits Number.	Body weight of rabbits	Value of plasma- volume at the first determination.	Value of plasma- volume at the second determination
1	2100 gr.	73,6 cc.	75,0 cc. + 1,4 c
2	2600	83,2	83,0 + 4,8
3	2000	71,5	78,1 ± 6,6
4	2500	81,0	85,5 + 4,5
5	1900	74,1	78,0 + 3,9
6	2200	70,0	74,3 + 4,3
7	2900	87,1	90,9 + 2,8
8	2800	85,8	91,5 + 5,7
9	2500	77,0	83,3 + 3,3
10	2500	77,0	83,2 + 6,2
11	2700	80,5	85,5 + 5,0
12	2800	84,0	85,5 + 1,5
13	2800	75,3	88,9 +13,6
14	2700	79,6	87,6 + 8,0
15	2900	89,1	94,0 + 4,9
16	2600	76,8	85,0 + 8,2
17	2300	72,9	81,0 + 8,1
18	2800	87,6	90,0 + 2,4
19	2100	74,5	81,5 + 7,0
20	2200	76,4	86,3 + 9,9
21	2300	72,0	77,0 + 5,0
On an average 78,5 cc.			84,1 cc. + 5,6 cc. + 7,13%

In my experiments, as table I shows, all cases showed a higher reading for the second determination. From these experimental facts, it is quite certain that the dye injected into the blood stream

is removed from the circulation in an appreciable amount, even within a few minutes after complete intermingling of dye. According to the investigation of Keith and his coworkers men have normally about 50 cc. of plasma per kilogram body weight. My experiments on rabbits, however, show that rabbits have relatively less plasma than men (about 33 cc. per kilogram), and moreover that the plasma volume of rabbits varies greatly with individuals even within the rabbits of similar body weight as will be seen in table I. It may probably be due to the fact that tissues of rabbits have a greater ability of absorbing the stain than the tissues of men and that the volume of rabbits plasma is subjected to greater and more sudden changes than that of men, as Keith and Rowntree have observed a similar fact in dogs.

From these experiments it can be concluded that the disappearance of dye (except the initial loss of undeterminable amount and nature), is not necessarily so slight as several authors state, and that it varies remarkably in degree even in the same species of animals experimented on. The second determination shows always a higher reading even when the interval is so short as 4 minutes.

As the disappearance of injected dye under normal conditions has been thus thoroughly investigated, I have next studied the change in the plasma volume during acute asphyxia. 1,5% solution of dye dissolved in the saline solution (0,2 cc. per kilogram body weight) was injected into the auricular vein. Exactly at 3,0 or 3,5 minutes after the injection, the first blood sample was obtained by heart puncture from the left ventricle. As soon as the first blood sample was taken, that is just at the time the needle was pulled out, the neck of the animal was immediately strangulated with caoutchouc tube by an assistant, or the previously exposed trachea was pinched with Kochers pincette (No. 29-34). The animal died generally within about 4 minutes. Immediately after the death of the animal, the exposed heart was punctured again and the second blood sample was got from the left ventricle.

As anticoagulant, a small quantity of powdered potassium oxalate was applied. Great care was taken to avoid the hemolysis and evaporation of blood. In connection with the other problem it was necessary to know whether the volume of plasma would change after death or not. I have, therefore, made use of this occasion to determine the change of plasma volume at intervals, varying from 10 to 15 minutes after the second blood sample had been taken (third determination). As is well known, the asphyxial blood generally coagulates more slowly than the normal blood(7), and the blood of rabbits killed by acute asphyxiation generally remains uncoagulated in the heart longer than 10 minutes. According to my observation, however, the blood obtained from the asphyxiated rabbits which had been injected with vital-red generally tends to coagulate sooner, and accordingly the blood is fairly often found coagulated in the heart even earlier than 10 minutes after death, and thus it very often becomes impossible to get the heart blood by puncture. The third determination, therefore, was performed only in a few cases. The result is shown in table II.

As will be seen in table II, nearly all cases except No. 39 showed a higher reading for the first determination, with the consequence that the total volume of plasma decreased by acute asphyxia. The deepening of the colour of dye in the plasma yielded from asphyxial blood could easily be recognized even with the naked eyes. In No. 39 the reading was the same before and after asphyxia. The decrease in the volume of total plasma is 7.7 per cent on an average.

As has been already illustrated in the preliminary experiment, the dye injected into the blood stream is continually leaving the blood circulation, very slowly as it may be, and the amount of dye disappearing in the following 4 minutes after the complete mixing of stain is responsible for the increase in the value of plasma volume corresponding, in 5.6 cc. of plasma, or 7.13 percent of the total volume of plasma. The value of plasma volume which is

TABLE II.

Rabbits Number.	Body weight of rabbits.	Value of plasma volume at the first determination.	Value of plasma volume at the second determination	Value of plasma volume at the third determination
22	3000 gr.	98,9 cc.	92,3 cc. — 6,6 cc.	
23	2600	75,6	72,4 — 3,2	
24	2400	72,7	70,0 — 2,7	
25	1900	74,0	73,0 — 1,0	73,0 cc.
26	2600	85,2	81,0 — 4,2	81,0
27	3000	101,1	86,4 — 14,7	
28	2050	75,6	65,8 — 9,8	
29	2700	83,0	79,2 — 3,8	
30	2500	76,5	66,0 — 10,5	66,0
31	2300	79,2	70,8 — 8,4	
32	2700	81,4	75,9 — 5,5	
33	2200	75,0	72,0 — 3,0	
34	2600	83,2	76,7 — 6,5	75,6
35	2250	74,5	63,0 — 11,5	63,0
36	2300	75,0	73,5 — 1,5	
37	2150	72,6	63,3 — 9,3	
38	2500	79,7	75,4 — 4,3	
39	2050	72,8	72,8 — 0	
40	2500	81,6	72,0 — 9,6	72,0
41	2200	72,0	66,0 — 6,0	66,0
42	2500	76,6	70,8 — 5,8	69,5
On an average 78,9 cc.			72,8 cc. — 6,1 cc. — 7,7%	

decreased by asphyxiation, that is 7,7% of the total volume, is, therefore, not the actual amount of decrease.

But it must be about 14,83 percent of the total volume if the 7,13 percent (the apparent increase of value due to the disappearance of dye during the experiment) is taken into account.

In 8 cases, where the postmortal change of plasma volume was examined, no appreciable change was found; namely, it remained

nearly unchanged for about 15 minutes after death from asphyxia.

The results of these experiments prove that, in acute asphyxia the total volume of plasma is almost always reduced, but it is difficult to decide manifestly whether the value of decrease found here (14,83%) can be taken as the actual loss of plasma volume or not, because we are incapable of knowing in this experiment whether the injected dye can disappear during asphyxia at the same rate as under the normal condition.

If the rate of disappearance of stain is the same in both cases, the decreased value of plasma volume may be taken as the actual amount of decrease, but on the contrary, if the tissues cannot possibly absorb the dye because of some embarrasment of tissues, due to asphyxiation, the 7,7 per cent of total plasma volume alone must be taken as the true value of decrease. And again, if the dye would be absorbed more easily by asphyxiating tissues than the normal, the actual loss of plasma may be greater than 14,83 (7,7-7,13) percent. Regarding the ability of asphyxiated tissues to absorb the molecules of dye, we know nothing at present.

## EXPERIMENT II.

In order to know the actual decrease of plasma volume, the change in the cell-function for absorbing the dye must be taken into consideration.

Thus we were pressed by necessity to examine what kinds of difference exist between the reabsorption of dye by the normal and asphyxiated tissues.

I have compared macroscopically as well as histologically the power of absorbing dye of normal tissues with that of the asphyxiated.

In the control experiment, healthy rabbits were first injected with the dye solution as in the former experiment, and 8 minutes later, sodium citrate solution (0,4 gm. per kilo.) of 8 percent was very slowly injected into the ear vein in order to prolong the coagulation of blood; then a large amount of air (about 20 cc.)

was immediately introduced into the same vessel through the needle which remained, to kill the animal by embolus as quickly as possible. After the animal died, the desired organs were cut off as fast as possible, and the blood contained in these organs was washed away with the saline solution for about 30 minutes by means of a fine needle introduced into the arteries. The requisite organs could be obtained within 45 to 50 minutes after the dye had been injected. On the other hand, animals were suddenly strangulated 3 minutes after the injection of dye, then the sodium citrate solution was directly but slowly injected into the heart through a hypodermic needle. After the animal died, the desired organs were immediately cut out and washed in a similar way as in the control experiment. In this way, some portions of the organs became perfectly freed from blood, even if on the whole the organs yet contained a good deal of blood. As organs for this examination, lung, liver, muscle, were chosen. The thoroughly washed portions of the organ were chipped off and hardened by use of formalin method; then the sections were prepared by means of freezing method with liquid carbonic acid. The sections were microscopically tested without any staining.

Microscopically examined, the asphyxial as well as the control tissues were not stained enough, and the difference in the degree of colouring could not be recognized. Macroscopically observed, however, the two kinds of tissues differed apparently in degree of staining. The normal tissues prepared with control organs, especially the lung, could be made in general stainless, nearly white, by washing repeatedly with the saline solution for about 30 minutes, and this was also the case with the asphyxial organs if not injected with dye. In asphyxial organs or tissues, however, it was nearly impossible to make them stainless in spite of frequent washings with saline solution; accordingly there remained always some stain. To beware of errors, of course, the hemorrhagia, which is very often found in asphyxial organs, were taken into consideration.

It is very conceivable that beside the cells of tissues, the blood cells may be influenced in some way by the asphyxiation. In the microscopic examination, however, no appreciable difference in the degree of colouration could be found between the control and asphyxial blood cells as in the cases of tissues. When, however, the blood cells were examined *in vitro* an interesting result was obtained. The examinations were carried on about as follows. A given quantity of 1 percent vital-red solution (3 or 4 cc.) were pippered into two test tubes, and a given volume of blood (exactly measured, 3 or 4 cc.) was added to the test tubes and thoroughly mixed. The one blood mixture was treated with  $\text{CO}_2$  for 15 minutes, and the other was left untreated for the same duration; then both of the blood samples were perfectly centrifugalised, and the supernatant fluids were entirely removed with great care. Then a given quantity of saline solution (accurately measured 5 cc.) was added to the sediments in the test tubes and thoroughly mingled. After several minutes the two samples were centrifugalised, and the two kinds of supernatant fluids were examined (the first normal and first asphyxial supernatant liquor). Then 5 cc. of saline solution was added again to both of the sediments in the test tubes and perfectly mixed. Several minutes later, both samples were thoroughly centrifugalised and the second supernatant fluids were examined (the second normal and second asphyxial supernatant liquor). In this way, the third, fourth, and fifth supernatant liquors were examined. The asphyxial supernatant liquor thus obtained by treating the blood with  $\text{CO}_2$  differed always in the concentration of dye from the normal supernatant liquor; namely it was stained deeper than the control. The colouring of asphyxial supernatant liquor could be recognized distinctly even when the control supernatant liquor had been colourless. The first normal and first asphyxial supernatant liquor were too deeply stained to distinguish the difference in the degree of colouring. But in the third and fourth supernatant liquor, the difference in degree of staining was very distinct between the

control and asphyxial blood. In every case of this examination, the error due to the hemolysis was avoided by preparing a control test which was treated with  $\text{CO}_2$  without adding dye. When, instead of treating the blood with  $\text{CO}_2$ , the asphyxial blood obtained from the heart of asphyxiated animals was examined, the results were almost the same, as will be described below.

5 cc. of 1 percent dye solution were exactly measured and put into each of two test tubes and then 5 cc. of the control blood as well as the same amount of asphyxial blood were added to each of the tubes respectively, and completely mixed. After 20 minutes both of the blood mixtures were thoroughly centrifugalised, and the supernatant fluid was entirely removed. Then a given quantity of saline solution (7 or 8 cc.) was accurately measured and added to the sediments, mildly but thoroughly mingled and centrifugalised. Thus two kinds of supernatant liquor were prepared (the first normal and first asphyxial supernatant liquor).

By adding the saline solution to both of the sediments and separating it again, the second, third, fourth and fifth supernatant liquors were successively prepared. For these examinations it was most important to measure exactly the amount of blood and the saline solution. The supernatant liquor must be entirely removed each time.

The result was identical with that obtained in the previous experiment, that is, in the third and fourth supernatant liquor, the difference in colouring between the normal and asphyxial liquor was most remarkable, the asphyxial supernatant liquor was always deeper stained and the colour remained longer.

Within the living organism these relations were also the same as will be described in the next experiment.

10 cc. of 3 percent solution of vital-red was injected into the ear vein of animals, and 3 minutes later about 7 cc. of control blood (non asphyxial) was obtained by heart puncture from the right ventricle. Immediately after the normal blood, that is control blood, had been withdrawn, the animal was strangulated by an

assistant. As soon as the animal expired, about 7 cc. of asphyxial blood were withdrawn by heart puncture from the right ventricle. 6 cc. of each kind of blood samples were measured exactly and put into test tubes, and left for about 20 minutes, shaking several times. 0,27 cc. of saline solution was then added to the asphyxial blood in order to adjust the concentration of dye in the asphyxial blood plasma to that in the normal blood plasma, because the asphyxial blood plasma contains always more dye (about 7,13 percent) as is shown in table I. In fact, by this addition of 0,27 cc. of saline solution, the colour of asphyxial plasma became nearly equal to that of the normal blood plasma, or slightly lighter than it. The blood samples were then thoroughly centrifugalised, and the stained supernatant plasma was carefully removed. 4 cc. of saline solution was added to both of the sediments, and after complete mixing they were centrifugalised, thus the first normal and first asphyxial supernatant liquor were obtained. By repeating this manipulation, various kinds of supernatant liquor could be prepared. In this experiment, the more of asphyxial blood is applied, and the less saline solution is added, the deeper stained was the supernatant liquor and the more remarkable was the result. By this experiment it was obviously demonstrated that the results obtained with a living animal is quite the same as that obtained in vitro; that is, the asphyxial supernatant liquors were always deeper stained than the normal. The difference appeared most distinctly in the second liquor.

In the next experiment, I have studied the absorption of dye with the long stored blood cells of rabbits instead of the asphyxial blood.

As experimental material, rabbits' blood which had been taken a few days before was employed. When blood is stored for a few days, slight hemolysis usually occurs in the plasma; it had, therefore, to be washed with the saline solution. 3 cc. of the washed stored blood cells were accurately measured and put into a test tube, and as the control 3 cc. of red blood cells were given into

another test tube without washing. Then 4 cc. of 1 percent vital-red solution were added to both kinds of blood cells, mixed and left aside for about 20 minutes. Then the samples were centrifugalised and the supernatant liquor was entirely removed. 6 cc. of saline solution was accurately measured and added to the sediments; after being thoroughly mixed, the blood samples were again centrifugalised. Thus the first supernatant liquor was prepared. The second, third and fourth liquor were prepared in succession in the same way.

The results thus obtained were also the same as before. The first supernatant liquors were too deeply stained, but in the second, third, and fourth liquors, especially in the third, the difference in colouring was very distinct, that is, the supernatant liquor yielded from the stored blood cells was denser in colour than that separated from the fresh blood cells.

All these experimental results seem to suggest that the tissues and blood cells are normally indiffusible or very slightly diffusible for vital-red. If, however, tissues or blood cells are denatured by some causes they become more diffusible for the staining matter. It is also very conceivable that the enhancement of acidity of blood and tissues denaturalize the cells and makes them more diffusible for dye.

I have further studied whether tissues become more diffusible for the dye when treated with dye in vitro. For this purpose, the animal was killed by air embolus, and a few organs such as lung, liver, brain, etc. were immediately cut out, and the blood contained in them was completely washed away in the same way as described before. These tissues could be made white by washing for about 20 minutes repeatedly with saline solution. Then they were cut into small pieces, and put into two test tubes containing a given quantity of 1 percent solution of dye. Tissues pieces in the one tube were treated with  $\text{CO}_2$  for about 20 minutes, while those in the other tube were left untreated. After 20 minutes, the contents of both tubes were cleanly washed in streaming water.

The tissue-pieces thus prepared differed distinctly from each other in the degree of colouring; that is, the tissues treated with  $\text{CO}_2$  were always deeper stained than the untreated.

These results of experiments *in vitro* may naturally not be identified with that in the body of asphyxiated animal, but it seems to be without doubt that the blood and tissues become more diffusible for dye during asphyxia.

It has been already mentioned that in the cases of acute asphyxia, the plasma volume constantly decrease. Now as the asphyxial blood cells and tissues are more diffusible for dye than the normal, the decrease in the total volume of plasma by asphyxiation must be greater than 14,8 percent, if the loss of dye due to the enhanced reabsorption during asphyxia is taken into account.

The results of experiments so far mentioned can be summarized as follows.

1. It is generally believed that vital-red is a dye which is not easily absorbed by tissues. According to my investigation, however, the absorption is not so slow as some authors assert. In my experiments on rabbits all cases showed a higher reading for the second determination made at the interval of 4 minutes after complete intermingling of dye, and correspondingly, the value of plasma increased without exception at the rate of 7,1 percent at the second determination.

2. As the dye injected disappears gradually, even if very slowly, the second reading ought to be higher than the first after the complete mixing of dye, and accordingly such cases in which the first reading was higher than the second, as a few authors have observed, may have been due to some technical errors.

3. Rabbits, compared with men, have relatively less volume of plasma, approximately 33 cc. of plasma per kilo body weight, and the rabbits of the same body weight have not always the same quantity of plasma.

4. The plasma obtained from the blood of left ventricle is coloured deeper than that separated from the blood of right

ventricle.

5. In acute asphyxia, the plasma volume decreases without exception; the average amount of decrease is over 14,8 percent of the total volume of plasma.

6. Tissues and blood cells of asphyxiated animal are more diffusible for vital-red than the normal.

7. The volume of plasma remains unchanged in the animal dead from acute asphyxia for about 10 to 15 minutes after death.

### EXPERIMENT III.

As already stated, it has been suggested by some authors that asphyxial blood may be condensated by dehydration. If the blood be thickened by asphyxiation it must become heavier than normal, and the specific gravity of blood must also be raised. Indeed this is indicated from the fact that the freezing-point of asphyxial blood is lower than that of the normal (7). It has also been demonstrated by several authors that when the blood cells are treated with  $\text{CO}_2$  (8) or acid (9) they usually swell out by taking up fluid. The condensation of blood during asphyxia, therefore, must take place only in plasma. The next experiment has been undertaken to determine how much the specific gravity of serum may be enhanced by asphyxiation. As control experiment, I have first determined the specific gravity of normal serum of rabbits, obtained from the blood of right ventricle, by means of the pycnometer. The results of 50 determinations are shown in table III.

As shown in table III the specific gravity of normal serum of rabbit varies fairly widely with the individuals; it ranges from 1020 to 1029, the average being 1024. Generally speaking, the

---

(7) Koranyi, A. v. u. Richter, P. E.: *Physikal. Chem. u. Medizin*, zweiter Band, S. 59; Yamakmi, K. (1900): *Tohoku Jour. of exp. Med.*  
(8) Humburger (1897): *Zeitschr. f. Biol.*, **35**, 252; Limbeck (1895): *Archiv f. exp. Path. u. Pharm.*, **35**, 309; Smirk (1928): *Brit. J. exp. Path.*, **9**, 81. (cited from *Physiol. Abstracts*, **13**, 355, 1928); Humburger (1896): *Zeitschr. f. Biol.*, **35**, 252. (9) Prince-Jones (1920): *J. Path. and Bact.*, **23**, 371.

TABLE III.  
Specific gravity of normal rabbits serum.

Rabbits number	Specific gravity	Rabbits number	Specific gravity	Rabbits number	Specific gravity
43	1026	60	1023	77	1021
44	1028	61	1026	78	1023
45	1029	62	1023	79	1022
46	1028	63	1023	80	1026
47	1027	64	1027	81	1025
48	1028	65	1027	82	1024
49	1022	66	1026	83	1024
50	1022	67	1023	84	1025
51	1022	68	1023	85	1024
52	1023	69	1022	86	1023
53	1020	70	1025	87	1022
54	1022	71	1025	88	1021
55	1023	72	1025	89	1021
56	1027	73	1028	90	1021
57	1022	74	1023	91	1024
58	1023	75	1027	92	1023
59	1027	76	1025		

specific gravity of rabbits' serums to be somewhat lower than that of human serum.

The specific gravity of asphyxial serum determined by the same method is shown in table IV.

The specific gravity of asphyxial serum lies between 1022 and 1032, the average being 1027. From these experiments, it is obvious that the specific gravity of serum is enhanced by asphyxiation, though the increase is very slight, and its increase corresponds to about 0.3 percent of the value of that of normal serum (the specific gravity of normal serum is 1024 on an average).

#### EXPERIMENT IV.

I have further determined in the next experiment the specific gravity of serum of one and the same animal before and after

TABLE IV.  
Specific gravity of asphyxial rabbits serum.

Rabbits number	Specific gravity	Rabbits number	Specific gravity	Rabbits number	Specific gravity
93	1025	103	1029	113	1029
94	1028	104	1029	114	1027
95	1024	105	1028	115	1025
96	1024	106	1028	116	1022
97	1027	107	1025	117	1026
98	1029	108	1027	118	1024
99	1028	109	1029	119	1022
100	1026	110	1028	120	1029
101	1032	111	1026	121	1026
102	1028	112	1027	122	1027

asphyxia, and estimated also the water content in serum. The estimation of water was carried out about as follows.

At first, the animal was fixed on the back, and the blood (before asphyxia) was withdrawn by heart puncture from the left ventricle. As soon as the blood had been taken the animal was strangled by an assistant. When the animal expired, the heart was immediately exposed and punctured again to get the asphyxial blood. In order to get the serum, the blood was quickly centrifugalised when the serum began to separate.

Then a certain quantity of the supernatant serum (2-5 cc.) was put into weighing bottles with glass stopper, and the bottles with serum were accurately weighed. The bottles were then placed in an exsiccator connected with a rotary air pump by means of strong caoutchouc tube, where the serum was dried up in 3 to 5 days. The bottles were then weighed again.

The other portion of remaining serum was used for the determination of specific gravity. The hemolysis and evaporation of serum were, of course avoided during the manipulation, and the foaming of serum which very often take place in the weighing bottles when the atmospheric pressure is suddenly lowered by the

air pump was carefully prevented. The weight of serum and of dried residue was obtained by subtracting the weight of empty bottles from the weight of bottles containing serum or dried residue, and the weight of total water contained in serum was calculated by subtracting the weight of the dried residue from the weight of serum. The result is shown in table V.

TABLE V.

No.	*	S. G.	W. S.	W. D. S.	W. W.	P. W.	D. or I.	C. P. S.
			gm.	gm.	gm.	%	%	%
123	{ B. A.	1021	4,3749	0,3372	4,0377	92,29		
	{ A. A.	1023	4,1274	0,3479	3,7795	91,56	-0,73	+0,24
124	{ B. A.	1021	4,9198	0,3907	4,5291	92,55		
	{ A. A.	1026	4,3117	0,4050	3,9067	90,60	-1,45	+0,48
125	{ B. A.	1021						
	{ A. A.	1022						+0,03
126	{ B. A.	1022						
	{ A. A.	1024						+0,18
127	{ B. A.	1023						
	{ A. A.	1026						+0,29
128	{ B. A.	1024	3,2954	0,2592	3,0362	92,13		
	{ A. A.	1029	4,3234	0,4103	3,9131	90,50	-1,63	+0,45
129	{ B. A.	1023	4,1511	0,3421	3,8090	91,76		
	{ A. A.	1026	4,4062	0,3916	4,0146	91,11	-1,65	+0,29
130	{ B. A.		3,5906	0,2776	3,3130	92,28		
	{ A. A.		4,2417	0,3714	3,8703	91,47	-0,81	
131	{ B. A.	1023	4,8493	0,3797	4,4696	92,17		
	{ A. A.	1026	4,7275	0,4029	4,3246	91,47	-0,70	+0,23
132	{ B. A.	1025	4,2202	0,3772	3,8430	91,06		
	{ A. A.	1028	4,6330	0,4465	4,1865	90,36	-0,70	+0,25
133	{ B. A.	1026	3,5346	0,3150	3,2196	91,08		
	{ A. A.	1028	3,5992	0,3508	3,2484	90,08	-1,0	+0,25
134	{ B. A.	1022	5,9538	0,2499	5,5239	92,77		
	{ A. A.	1027	5,4657	0,4827	4,9850	91,11	-1,66	+0,48
135	{ B. A.	1022	3,7052	0,2918	3,4134	92,12		
	{ A. A.	1024	4,3193	0,3713	3,9480	91,43	-0,69	+0,17
136	{ B. A.	1021	3,5138	0,2883	3,2255	91,79		
	{ A. A.	1027	3,2880	0,3245	2,9635	90,13	-1,66	+0,64
137	{ B. A.	1024						
	{ A. A.	1027						+0,32
138	{ B. A.	1023						
	{ A. A.	1028						+0,45
139	{ B. A.	1022						
	{ A. A.	1028						+0,56

Table V. (Continued)

No.		S. G.	W. S.	W.D.S	W. W.	P. W.	D. or I.	C. P. S.
			gm.	gm.	gm.	%	%	%
140	{B. A.	1021	5,9026	0,4350	5,4676	92,63	-0,23	+0,05
	{A. A.	1022	5,2668	0,4000	4,8668	92,40		
141	{B. A.		2,6074	0,2148	2,3926	91,76	-0,02	
	{A. A.		2,3851	0,1968	2,1883	91,74		
142	{B. A.		2,6753	0,2376	2,4377	91,20	-1,29	
	{A. A.		2,9159	0,2940	2,6219	89,91		
143	{B. A.	1023	3,3253	0,2653	3,0600	92,02	-1,87	+0,52
	{A. A.	1029	4,2831	0,4213	3,8618	90,15		
144	{B. A.	1023	3,6737	0,3085	3,3652	91,60	-1,15	+0,35
	{A. A.	1026	3,3543	0,3203	3,0340	90,45		
145	{B. A.	1024	4,0072	0,3184	3,6888	92,05	-1,09	+0,29
	{A. A.	1027	4,5898	0,4147	4,1751	90,96		

No. .... Number of rabbits.

B.A. .... Before asphyxia.

A.A. .... After asphyxia.

S.G. .... Specific gravity.

W.S. .... Weight of serum.

W.D.S. .... Weight of dried residue.

W.W. .... Weight of water in serum.

P.W. .... Percentage of water.

D. or I. .... Decrease or Increase in percentage of water.

C.P.S. .... Change in percentage of S.G.

As will be seen in the table, the specific gravity of normal serum when determined in this way, varies from 1021 to 1026, the average being 1023. It accords very well the results of experiment IV. The specific gravity of serum became higher in all cases after asphyxia. It was raised to 1027 on an average (rise of 0,3 percent of normal value).

On the other side, the normal serum of rabbits, as shown in the same table, contained 91,06 to 92,77 percent of water (on an average 91,92 percent), and the water content of serum decreased in all cases of acute asphyxia; namely the percentage of water in serum was reduced to 90,09 on an average, the decrease in the amount of water being 1,83 percent.

#### EXPERIMENT V.

In this experiment, the amount of water in the whole blood was determined in the same way as before. The result is described in table VI. Though slight in degree, as the table shows, the

TABLE VI.

No.	B. W.		W. B.	W. D. R.	W. W.	P. W.	D. or I.
			gm.	gm.	gm.	%	%
146	2200	{B.	5,1036	0,8137	4,2899	84,05	
		{A.	6,2305	1,0117	5,2188	83,76	-0,29
147	2500	{B.	5,1163	0,9357	4,1806	81,71	
		{A.	4,6555	0,9118	3,7437	80,41	-1,30
148	2500	{B.	5,5985	0,8116	4,7869	82,50	
		{A.	3,9595	0,6336	3,3259	83,99	-1,51
149	2000	{B.	3,5900	0,6178	2,9722	82,79	
		{A.	5,1657	0,9447	4,2210	81,71	-1,08
150	1500	{B.	3,9615	0,5582	3,4033	85,90	
		{A.	4,5771	0,6667	3,9104	85,43	-0,47
151	2150	{B.	4,3175	0,8939	3,4236	79,29	
		{A.	2,9318	0,6235	2,3089	78,75	-0,54
152	2250	{B.	3,3546	0,7083	2,6464	78,82	
		{A.	3,3501	0,7335	2,6166	78,10	-0,72
153	2050	{B.	3,2195	0,6627	2,5568	79,47	
		{A.	3,2115	0,6802	2,5313	78,81	-0,66
154	2000	{B.	2,5644	0,4350	2,1294	83,03	
		{A.	3,3303	0,5754	2,7549	82,72	-0,31
155	2610	{B.	3,8044	0,7775	3,0269	79,58	
		{A.	3,0796	0,6593	2,4103	78,26	-1,32
156	2450	{B.	3,4177	0,6172	2,8005	81,94	
		{A.	3,4335	0,6403	2,7932	81,35	-0,59
157	2500	{B.	2,1426	0,3685	1,7741	82,80	
		{A.	2,1084	0,3875	1,7209	81,61	-1,19
158	2600	{B.	1,8480	0,3308	1,5172	82,09	
		{A.	3,1400	0,5882	2,5518	81,23	-0,86
159	2600	{B.	2,9021	0,3248	1,5773	82,97	
		{A.	2,6619	0,4667	2,1952	82,46	-0,51
160	2500	{B.	2,1208	0,4092	1,7116	80,70	
		{A.	2,1962	0,4262	1,7700	80,59	-0,11
161	1200	{B.	2,7078	0,5351	2,1727	80,23	
		{A.	2,2062	0,4434	1,7628	79,90	-0,33

No. .... Number of rabbits.

B.W. .... Body weight of rabbits.

B. .... Before asphyxia.

A. .... After asphyxia.

W.B. .... Weight of blood.

W.W. .... Weight of water in serum.

W.D.R. .... Weight of dried residue. P.W. .... Percentage of water content in 100 gm. of blood.

the same as that of serum. The decrease in the percentage of water was 0,11 to 1,51 percent on an average 0,73 percent by weight.

#### EXPERIMENT VI.

The lowering in the percentage of water content of the asphyxial blood and serum which has been demonstrated by the previous experiments, does not indicate the actual loss of water in them, but it shows nothing but the change in the ratio of weight of serum or blood to that of water contained in them. It does not directly indicate the rate of dehydration in the asphyxial blood, because when blood or serum becomes heavier or lighter by the increase or decrease of heavy constituents of blood and serum, the percentage value of water content becomes relatively lower or higher, even without an appreciable change in the amount of water. In view of the experimental facts, that is the enhancement of specific gravity of asphyxia serum and the lowering of freezing point of asphyxial blood(8), it is evident that the asphyxial blood and serum is heavier than the normal. It is obvious that, therefore, the degree of dehydration in the asphyxial blood or serum can not exceed 0,73 or 1,83 percent of water, even if the reduced percentage value of water is entirely attributed to the actual loss of water by asphyxiation.

Hence I have investigated in the next experiment whether the fall of percentage value of water in the asphyxial blood is entirely due to the actual loss of water or not. The experiment was carried out as follows. A given volume of serum (5 or 4 cc.) prepared in the same way as in the previous experiment, was accurately pippered into weighing-bottles by use of Ostwald's pippete, immediately weighed and dried up in a vacuum desiccator as before. Thus the water contained in a given volume of serum was estimated by weight before and after asphyxia.

As is shown in table VII, the water contained in serum has actually decreased in amount without exception after asphyxia.

TABLE VII.

No.	B. W.		V. S.	W. S.	W. D.	W. W.	I. or D.	W. W. per 100 cc.
			(cc.)	(mg)	(gm.)	(gm.)	(gm.)	(gm.)
162	2200	{ B. A.	5	5,0940 5,1026	0,4034 0,4279	4,6906 4,6747	-0,0159	-0,3180
163	2500	{ B. A.	5	5,0926 5,1081	0,3919 0,4453	4,7007 4,6628	-0,0397	-0,7580
164	2600	{ B. A.	5	5,0943 5,1053	0,3998 0,4148	4,6945 4,6905	-0,0040	-0,0800
165	2250	{ B. A.	5	5,1299 5,1452	0,5192 0,5812	4,6107 4,5640	-0,0467	-0,9340
166	2500	{ B. A.	4	4,0699 4,0817	0,3207 0,3619	3,7492 3,7198	-0,0294	-0,7350
167	2100	{ B. A.	5	5,1129 5,1385	0,4516 0,5258	4,6613 4,6127	-0,0486	-0,9720
168	2100	{ B. A.	5	5,1054 5,1188	0,4262 0,4696	4,6792 4,6492	-0,0300	-0,6000
169	1800	{ B. A.	5	5,0932 5,1007	0,3885 0,4088	4,7047 4,6919	-0,0128	-0,2560
170	2000	{ B. A.	4	4,0754 4,0845	0,3387 0,3602	3,7367 3,7243	-0,0124	-0,3200
171	2000	{ B. A.	4	4,0688 4,0786	0,3113 0,3471	3,7550 3,7315	-0,0260	-0,6700
172	1800	{ B. A.	4	4,0693 4,0779	0,3148 0,3547	3,7545 3,7232	-0,0313	-0,7825
173	3000	{ B. A.	4	4,0791 4,0990	0,3386 0,3971	3,7405 3,7019	-0,0386	-0,9650
174	2000	{ B. A.	4	4,0691 4,0878	0,3324 0,3796	3,7367 3,7082	-0,0285	-0,7125

No. .... Number of rabbits.

B.W. .... Body-weight of rabbit.

B. .... Before asphyxia.

A. .... After asphyxia.

V.S. .... Volume of serum employed.

W.S. .... Weight of serum.

W.D. .... Weight of dried residue.

W.W. .... Weight of water in serum.

I. or D. .... Weight of water increased or decreased in serum.

W.W. per 100 cc. .... Weight of water increased or decreased per 100 cc. serum.

The amount of decrease varied from 0,25 or 0,95 gm., on the average 0,62 gm. per 100 cc. serum.

The estimation of water in the whole blood could not be directly carried out because of the quick coagulation of blood. The blood cells, however, swell up in the asphyxial blood by taking up water, and the dehydration takes place only in serum, the extent of dehydration in the whole blood must therefore be smaller than that in serum. If the facts are taken into consideration that the corpuscular elements occupy about half of the blood volume, and that they are not dehydrated, but on the contrary, they are hydrated by asphyxia, the actual loss of water in the asphyxial blood must be estimated far less than 0,62 gm., about the half of 0,62 gm., per 100 cc. blood.

From these experimental facts it can be concluded that in acute asphyxia the percentage of water is lowered in the serum by 1,83 percent and in the blood by 0,73 percent by weight. But the actual amount of dehydration in the asphyxial serum is only about 0,62 gm. per 100 cc. and that in the whole blood would be far less than this (about half of 0,62 gm.). The weight of 100 cc. of rabbits' serum lies between 101,852 and 102,598 gm., on an average 102,05 gm. And the weight of 100 cc. blood ranges from 103,89 to 105,11 gm. and averages 104,83 gm. The actual loss of serum-water due to the acute asphyxia is, therefore, about 0,6 percent by weight, and that of blood-water would be far less than this (about 0,3 percent).

#### EXPERIMENT VII.

Beside the acute asphyxia, some cases of prolonged-asphyxia have been investigated as will be described in the following. In this experiment, the control blood (about 3 cc.) had first been taken by puncturing the heart of rabbits, and then the animals were put into a glass vial having a capacity of about 12000 cc. and closed up airtight. The asphyxia produced in this manner will be denoted prolonged asphyxia in this paper. As soon as the animal

died, the heart was punctured again to get the asphyxial blood. The blood samples were always collected from the left ventricle. The preparation of serum and the estimation of water were carried out in the same way as in the cases of acute asphyxia, and the actual change in the amount of, as well as the change in the percentage of water in a given volume (4 or 2 cc.) of serum have been investigated. The result is shown in table VIII.

#### EXPERIMENT VIII.

As is shown in table VIII, the percentage of water in the serum increased during the prolonged-asphyxia quite contrary to the cases of acute asphyxia. And the actual amount of water contained in a given volume of serum also increased, while the dried residue reversely decreased in amount. Moreover, the asphyxial serum always reduced in weight compared with the control serum. These facts prove evidently that in the prolonged-asphyxia, the dehydration of serum never do occur, but on the contrary, the hydration and the dilution of serum due to hydration take place, contrary to the suggestion of some authors. The results of water estimation with the whole blood, as described in table IX, was almost entirely identical with that obtained with the serum; that is, in all cases the water percentage of whole blood has been raised by the prolonged-asphyxia, and the actual content of water in a given volume of whole blood (No. 193-198) has also been augmented. The reduction in the weight of whole blood, however, was not constant. It will probably be due to the technical errors caused by the difficulty of pipetting accurately the desired amount of whole blood, because of dense and quick clotting of blood.

Anyhow it has been definitely proved by these experiments that in prolonged asphyxia the dehydration takes place, neither in the serum nor in the whole blood, but on the contrary, hydremia and dilution of blood are always manifest.

TABLE VIII.

No.	B. W.	*	V. S.	W. S.	W. D.	W. W.	I. or D.	C. 100. S.	M.
			(cc.)	(gm.)	(gm.)	(gm.)	(gm.)	(gm.)	
175	2450	{ B. A.	4	4,0849 4,0832	0,3592 0,3537	3,7257 3,7295	+0,0038	+0,095	135
176	2100	{ B. A.	4	4,0674 4,0614	0,2960 0,2806	3,7714 3,7808	+0,0094	+0,235	115
177	2600	{ B. A.	4	4,0777 4,0743	0,3704 0,3650	3,7073 3,7093	+0,002	+0,0505	95
178	2600	{ B. A.	4	4,0981 4,0893	0,4178 0,3999	3,6803 3,6894	+0,0091	+0,2275	120
179	2650	{ B. A.	4	4,0937 4,0870	0,3820 0,3419	3,7117 3,7451	+0,0334	+0,835	145
180	3300	{ B. A.	2	2,0531 2,0491	0,1632 0,1405	1,8899 1,9086	+0,0374	+0,9350	125
181	2000	{ B. A.	2	2,0541 2,0480	0,1687 0,1588	1,8854 1,8892	+0,0038	+0,19	140
182	2200	{ B. A.	2	2,0569 2,0490	0,1769 0,1591	1,8800 1,8899	+0,0099	+0,455	125
183	1800	{ B. A.	2	2,0519 2,0449	0,1698 0,1453	1,8821 1,8996	+0,0075	+0,355	140
184	2000	{ B. A.	2	2,0640 2,0613	0,2149 0,1934	1,8491 1,8679	+0,0188	+0,9	135
185	2100	{ B. A.	2	2,0852 2,0544	0,2160 0,1791	1,8692 1,8753	+0,0061	+0,3050	155
186	2300	{ B. A.	2	2,0572 2,0581	0,1641 0,1413	1,9131 1,9163	+0,0037	+0,185	130

No. .... Number of rabbits.      B.W. .... Body-weight of rabbit.

B. .... Before asphyxia.      A. .... After asphyxia.

V.S. .... Volume of serum employed. W.S. .... Weight of serum.

W.D. .... Weight of dried residue.      W.W. .... Weight of water in serum.

I. or D. .... Increase or decrease in the weight of water.

C. 100 S. .... Change in the weight of water per 100 cc. serum.

M. .... Minutes elapsed from the beginning of asphyxia to the death of animal.

TABLE IX.

No.	B. W.		W. B.	W. D.	W. W.	P. W.	I. or D.	M.
			(gm.)	(gm.)	(gm.)			
187	2450	B.	2,7607	0,5218	2,2389	81,09		
		A.	2,4326	0,4305	2,0021	82,30	+1,21	135
188	1200	B.	3,1095	0,6675	2,4420	78,53		
		A.	3,0115	0,6325	2,3789	78,99	+0,46	115
189	2600	B.	3,0447	0,6586	2,3861	78,70		
		A.	3,9433	0,7490	3,1943	81,00	+2,30	95
190	3000	B.	2,7610	0,5932	2,1678	78,51		
		A.	3,3530	0,6995	2,6535	79,16	+0,65	110
191	2600	B.	3,0370	0,6561	2,3809	78,39		
		A.	3,9236	0,8058	3,1178	79,43	+1,04	120
192	2650	B.	2,6269	0,5246	2,1023	80,29		
		A.	3,6684	0,6410	3,0274	82,52	+2,23	145
193	2250	B.	2,0917	0,4100	1,6817	80,39		
		A.	2,0987	0,4177	1,6810	80,57	+0,18	145
194*	2700	B.	2,0778	0,4065	1,6713	80,43		
		A.	2,0805	0,3841	1,6964	81,53	+1,10	115
195*	2850	B.	2,0991	0,4298	1,6693	79,52		
		A.	2,0902	0,3771	1,7131	81,95	+2,43	100
196*	2500	B.	2,1022	0,4521	1,6501	78,48		
		A.	2,1013	0,4183	1,6830	80,08	+1,60	126
197*	2900	B.	2,0961	0,4350	1,6611	79,24		
		A.	2,0925	0,4181	1,6744	80,00	+0,76	140
198*	1250	B.	2,0837	0,4066	1,6771	80,48		
		A.	2,0857	0,3922	1,9935	81,19	+0,71	150
199*	3000	B.	2,0891	0,4143	1,6748	80,16		
		A.	2,0940	0,4049	1,6891	80,66	+0,50	220

No. .... Number of rabbits.

B.W. .... Body-weight of rabbit.

B. .... Before asphyxia.

A. .... After asphyxia.

W.B. .... Weight of blood employed. W.D. .... Weight of dried residue.

W.W. .... Weight of water in blood. P.W. .... Percentage of water in blood.

M. .... Minutes elapsed from the beginning of asphyxia to the death of animal.

I. or D. .... Percentage of blood water increase or decrease.

\* .... Directly determined with the whole blood.

## DISCUSSION.

As has been established in experiment II, the total volume of plasma always decreases in acute asphyxia. This fact is in good accordance with the suggestion made by many authors. If it is caused merely by the dehydration in plasma the amount of water released from blood must be greater than 14,83 percent of total volume of plasma. According to Lamson and Nagayama, the volume of circulating plasma is influenced by several conditions, such as changes in the diameter of small vessels, variation in the rate and force of heart beat, actual loss or gain of fluid etc. The changes in the volume of circulating plasma caused by these various conditions can be shown by the vital-red method, but the differentiation between vaso motor change, stagnation, and fluid exchange can not be made easily. The decrease in plasma volume due to acute asphyxiation (over 14,83 percent) may not be due solely to the reduction of water in plasma, but it may result from other conditions without dehydration in blood. In fact, we found that the actual decrease in the amount of blood water is far less than 0,6 percent (about one half of 0,6 percent) as has been demonstrated in experiment VI. Lamson and Nagayama state that in the case of acute loss of fluid, even large molecules of the plasma pass out into the lymphatics of liver with great ease. The decrease in plasma volume during the acute asphyxiation should not be attributed merely to the reduction of water, but it is mostly due to the release of plasma as such from the circulating blood. Regarding this point, the investigation of specific gravity of asphyxial serum is very significant. When the plasma is concentrated by the dehydration in blood, the enhancement of specific gravity of serum should necessarily be consequenced, and if the condensation of serum by asphyxia results from the dehydration alone, the rise of the specific gravity of serum will manifest itself in proportion to the rate of the reduction of serum water. If the decrease in plasma volume by the acute asphyxiation is caused

solely by the water release from blood, the specific gravity of serum should be raised also at an identical rate with the decrease of plasma volume, that is at the rate of 14,83 percent. As obviously is shown in experiment III and IV, the specific gravity of serum is constantly raised by acute asphyxia, but only very slightly. The rise in the specific gravity is about 0,3 percent, on an average. From the result of investigation of specific gravity it is also quite evident that the decrease in the plasma volume by acute asphyxiation is almost entirely due to the reduction of plasma itself, and not to the decrease of water in plasma.

The most important problem in the present paper is to speculate the relation of the concentration of various blood constituents to the dehydration, that is, to determine whether the increase in the amount of several blood constituents during asphyxia can be satisfactorily explained on the dehydration of blood during asphyxia. It is very conceivable that the enhancement in the osmotic pressure and in the acidity of tissues due to asphyxiation may cause the release of water from blood.

And indeed I could confirm it experimentally as has been described in experiment VI. But as I have repeatedly stated, the degree of dehydration in the asphyxial blood is very slight against expectation. It reaches hardly to about 0,3 percent of water in the whole blood by weight. If the increase in the percentage of various blood constituents such as Ca, Cl etc. is due solely to dehydration it would not exceed this limit. But the amount of increase of several blood constituents estimated by many investigators is remarkably larger than this, as is shown in table X. And it is very noteworthy that the increase is, as a rule, more remarkable in prolonged-asphyxia than in acute asphyxia, while in the former no dehydration but hydremia takes place. This is especially the case with phosphorus, magnesium and iron. Collip states that the condensation of blood is sufficient to account for the increase in serum calcium and inorganic phosphorus. But such can not be the case. The increase in the amount of various blood constituents

TABLE X.

Author.	Condition	Ca.	K.	Mg.	Na.	Inorg. P.	Hemo- globin.	Serum protein.	CL.	Total N	Non-prot- ein N	Fe.
Collip	Acute asphyxia	13%				8%						
	Prolonged asphyxia	3,7 - 37,5%										
Hall	Prolonged asphyxia					61%	72%			33%	44%	10
Yamakami	Acute asphyxia								9%			
Kubo	Acute asphyxia	28%	41%						26%			
Yoshida	Acute asphyxia							1,3%				
Saso		15%	10%	100%	21%	33%	(Prolong. asphy.)		6%			
Yoshida	Prolonged asphyxia							±				
Saso	Acute asphyxia								8%			

must be brought about mainly by the actual increase of each constituent in blood; in other words, it must be attributed mostly to the emigration of substances into the blood stream from tissues, though the increase not exceeding 14,83 percent may also be attributed to such a mechanism that the plasma leaves some constituents behind in the circulating blood, when it gets into the asphyxiated tissues. In this respect the fact is very significant that in the acute asphyxia, as is shown in tables V and VII, the decrease of the percentage of water content in serum and blood does not accord with that of the actual loss of water. The average decrease in the percentage of water is 1,83 percent in the serum, while the actual loss of water is about 0,6 percent. This difference between the apparent and actual loss of water must be caused by some factors other than the dehydration of serum.

In prolonged-asphyxia, as already mentioned, no dehydration is found either in serum or in blood, but on the contrary both the apparent percentage and the actual content of water, increase in the blood. And the weight of serum as well as that of the dried residue decrease without exception though the change in the weight of blood is not constant. According to the investigation made by M. Yamada, there exists some difference between acute and prolonged-asphyxia in respect to the change in the amount of blood protein. Our experiments have also demonstrated that these two sorts of asphyxia differ quite from each other as to the water interchange between blood and tissues. In short, the volume of plasma decreases in a fairly appreciable amount during asphyxia, but even in the acute asphyxia, the actual amount of dehydration is very small, and in the case of prolonged asphyxia, not dehydration of blood but hydremia occurs. The reduction of plasma volume must, therefore, be attributed not to the condensation of blood due to dehydration but mostly to the emigration of plasma as such from the circulation into tissues or lymphatic system, and consequently the augmentation of various blood constituents, such as Ca, Mg, Cl, Fe, P, N. etc. during asphyxia must be assigned to

the emigration of these substances into blood or to such a mechanism that these substances are left behind when plasma passes into tissues. At all events, the part played by the dehydration of blood in causing the increase of various blood constituents is very slight.

#### SUMMARY.

1. In acute asphyxia the total volume of plasma decreases constantly at the rate of over 14,83 percent.

2. The decrease in the plasma volume by the acute asphyxiation has almost nothing to do with the dehydration of blood.

3. The specific gravity of serum is always raised by acute asphyxia; it rises at the rate of about 0,3 percent on an average.

4. In acute asphyxia, the dehydration of blood and serum can certainly be found, but contrary to our expectation it is very slight; it is about 0,6 percent in the serum and about 0,3 percent in the blood, on an average.

5. In prolonged asphyxia, the water content in blood and serum always increases, contrary to the acute cases, and the dehydration of blood never occurs.

6. In acute asphyxia, the dehydration of blood may play a part in causing the increase in the amount of various blood constituents, but it can not be the main factor. The emigration of various substances into the blood stream from tissues plays the leading rôle in enhancing their percentage in the asphyxial blood.

7. As no dehydration of blood but hydremia always occurs in prolonged asphyxia, the increase in various blood constituents here is entirely due to other causes than the condensation of blood by dehydration.

#### REFERENCES.

- Binet and Leon (1928): Congress Zentr. bl. f. die gesam. Inn. M., 98, 829.  
Rittmann u. Rudolf (1927): Zeitschr. f. d. ges. Med., 56, 262.  
Yamakami (1922): Tohoku Jour. of exp. Med., 3.

- Collip (1927): Journ. of Biol. Chem., **74**, 28.  
Hall (1926): Journ. of Biol. Chem., **67**, 549.  
Yoshida, M.: Hokkaido Igaku Zasshi, No. 4, 659.  
Keith, Rowntree and Geraghty (1915): Arch. Int. Med., **16**, 547.  
Lamson and Nagayama (1920): Jour. of Pharm. and exp. Therap.,  
**15**, 331.  
Terry and Seib (1927): Anat. Rec., **36**, 279.



## ON THE NATURE OF THE EFFECT OF THE ADDITION OF SALT UPON THE SURFACE TENSION OF SODIUM TAUROCHOLATE SOLUTION.

BY

MASAIÉ SHIONO.

*(From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University,  
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, August 17, 1930.)

### INTRODUCTORY.

That the addition of sodium chloride to the sodium taurocholate solution affects the lowering of surface tension of the latter to a considerable degree is widely known. Dr. Itoi (1930) studied the effect of various salts on the surface tension of the sodium taurocholate and reported his results in this journal. According to him, salts with varying cation exhibit, even in small concentration, differences in the effect on the surface tension of sodium taurocholate when the acidity of the solution is low, and show that the effectiveness is larger the higher the valency of cation of the salt is. At the higher acidity this difference almost disappears. The effect of the addition of salts in this case does not depend on the nature of the cation, showing dependence largely on the nature of anion or the salt as a whole. This latter effect is easily conceivable with the idea that various salts are hydrated and deprive of the volume of water according to the degree of hydration. As regards the nature of various cations which affects the surface tension of the solution at a much lower concentration in acid reaction, the mechanism is not obvious. To search for this mechanism is the object of the present study and the result is reported in the succeeding paragraphs.

## II. METHODS AND MATERIALS.

*The measuring method.*—While Dr. Itoi determined all of the surface tension of his materials by the method of du Noüy, I have used always the stalagmometric method for the measurement of surface tension of my solution. The reason for my preferring this method to the tensiometric method is twofold; first, the number of our determination is, as will be shown below, numerous and requires a lot of space even to perform one series of experiments, while, secondly, the value of surface tension measurement in the case of sodium taurocholate solution gives almost a comparable result between both stalagmometric and tensiometric methods. The stalagmometer was always cleaned by dipping it into bichromate and sulphuric acid mixture and well washed with distilled water and dried. The number of drops for distilled water was 55.7 at 20°. The surface tension of the solution of various kinds under the experiment was expressed in the value of relative surface tension, the number of drops of distilled water at an experimental temperature being divided by the number of drops of the solution at the same temperature and this ratio being multiplied by the specific weight of the solution. The reading of the measurement of the number of drops is taken exactly as far as a tenth of a drop.

*Sodium taurocholate.*—Sodium taurocholate used throughout this experiment was “Sodium taurocholate. II. Merck”, which out of many samples examined, contained the least amount of sodium chloride. 0.002 mol. solution was prepared with this salt and 10 cc. of this solution was added with a proper amount of various salt solution, the effect of which is to be proved, so that a thousandth normal sodium taurocholate solution containing a definite amount of respective salts was obtained.

*Taurocholic acid.*—The taurocholic acid was prepared from commercial sodium taurocholate as follows. 10 gm. of sodium taurocholate was dissolved into 500 cc. of alcohol and the solution was decolorized with animal charcoal. The filtrate was then added

with twice its volume of ether. The precipitate produced by this treatment became crystalline and was filtered, thoroughly washed with ether and dried. The sample was found to be almost free of chloride. 10 gm. of sodium taurocholate was dissolved into 200 cc. of alcohol and mixed with 100 cc. of 6% alcoholic solution of hydrochloric acid. To the mixture there was then added three times its volume of ether. The precipitate produced was once washed with ether and dissolved in a necessary amount of absolute alcohol and precipitated again with the addition of ether. This procedure was repeated several times, until the sample became almost free of chloride. To remove the last trace of chloride, the sample was dissolved into distilled water and placed between two platinum electrodes of 500 volts in an electrodialysing apparatus. After 24 hours, the current intensity became constant and the solution was found free of chloride. The solution was with repeated additions of alcohol, evaporated under diminished pressure at a temperature not exceeding  $40^{\circ}$ . To the concentrated alcoholic solution, was then added three times its volume of ether, and the pure taurocholic acid thus precipitated was dried. The sample was entirely colourless and contained just a required amount of nitrogen and sulphur.

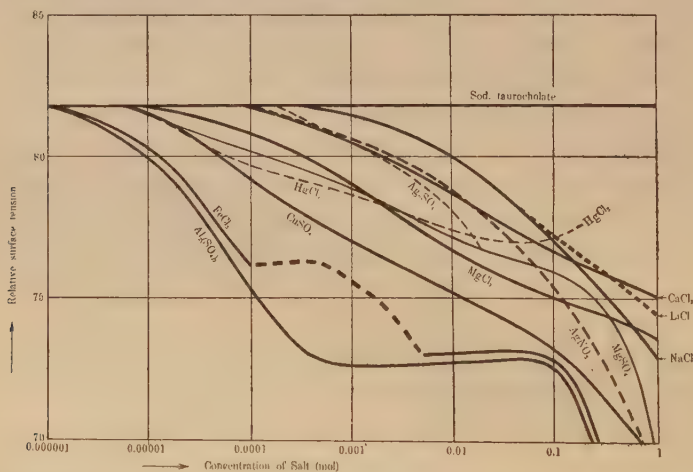
*Electrolytes.*—Electrolytes used were NaCl, LiCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  and  $\text{FeCl}_3$  and were all Kahlbaums samples. With all of these salts many solutions of various concentrations as 0.002, 0.004, 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4 mol were prepared. In the experiment, the mixture of 10 cc. of solution thus obtained and 10 cc. taurocholate solution gave 0.001 mol. taurocholate solution, containing the respective salts in half of the above mentioned concentration.

III. THE EFFECT OF THE ADDITION OF ELECTROLYTE ON THE RELATIVE SURFACE TENSION OF TAUROCHOLATE SOLUTION MEASURED BY STALAGMOMETRIC METHOD.

1. *The influence of the salt concentration on the result.*

In this experiment the effect of the addition of various salts in increasing amount to the sodium taurocholate on the surface tension of the latter was followed. The result is shown in table I and figure 1.

Fig. 1.



As will be seen from the table and figure there is a considerable difference of effect observable among different kinds of salts according to the valency of their cations, when the concentration of salt is low, while in the high concentrations the difference almost disappears and in still higher concentration various divergent courses are taken. The effect in the concentrated solution, higher than 0.1 mol. of salt, can be easily understood as the effect of hydration of added electrolytes. This is also shown in the ex-



periment of Itoi (1930) with salts composed from sodium ion and various anions. The effect in lower concentrations is, however, entirely dependent on the nature of cations. While the effect of the addition of salt is observable at a concentration lower than 0.000005 mol. in the case of aluminum and ferric salt, at 0.00002 mol. in case of copper salt, and at the concentration lower than 0.00005 mol. in case of calcium and magnesium, the effect of the addition of salt with monovalent cation is only seen at a concentration near 0.001 mol.

*2. The influence of taurocholate concentration on the effect of the addition of salt.*

To study the effect of the addition of electrolytes on sodium taurocholate solution thoroughly it is necessary to follow the effect in differently concentrated taurocholate solutions. I have, therefore, repeated the above mentioned measurements of the surface tension of taurocholate solution with the addition of various amounts of salt on 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.01 and 0.02 mol solution of sodium taurocholate. The result is shown in table II-IX and figure 2-9.

As will be seen in tables and figures, the lowering of the surface tension of taurocholate solution under certain concentration increases with the concentration of the added electrolyte. At a certain concentration of sodium taurocholate, the value of which differs according to the nature of electrolyte added, however, the surface tension of the solution is elevated with the amount of the electrolyte added. In the further increase of the sodium taurocholate solution, the surface tension of the solution with various concentrations of added electrolyte tends to the same maximum value, which seems to differ according to the nature of electrolyte added. All these phenomena shown among the differently concentrated sodium taurocholate solutions can be readily interpreted as the result of augmentation of the one or the other kind of taurocholate molecules at the surface layer of the solution.

TABLE II.

Nature of salt	Concentration of salt	Concentration of sod. taurocholate (mol)						
		0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.01	0.02
NaCl	0.001	81.2	75.3	71.8	69.9	67.7	63.5	61.8
	0.002	81.1	75.3	72.0	69.6	60.4		
	0.005	80.7	74.9	71.9	69.7	60.6	62.9	61.7
	0.01	80.1	74.2	71.3	69.6	62.5		
	0.02	78.8	73.7	70.7	68.9	64.1	62.7	16.6
	0.05	78.0	72.5	69.6	68.3	65.3		
	0.1	77.0	71.6	69.4	67.6	66.3		
	0.2	75.7	71.0	68.8	66.3	67.2	61.9	61.4
	0.5	74.2	69.7	66.7	63.9	68.2		
	1.	72.7	67.8	63.9	61.9	68.1	59.6	60.6
	2.	70.3	64.2	61.3	60.3	68.4		
	4.	64.8	63.4	62.8	67.4	68.3		
	0	81.7	75.7	72.1	70.2	68.7		

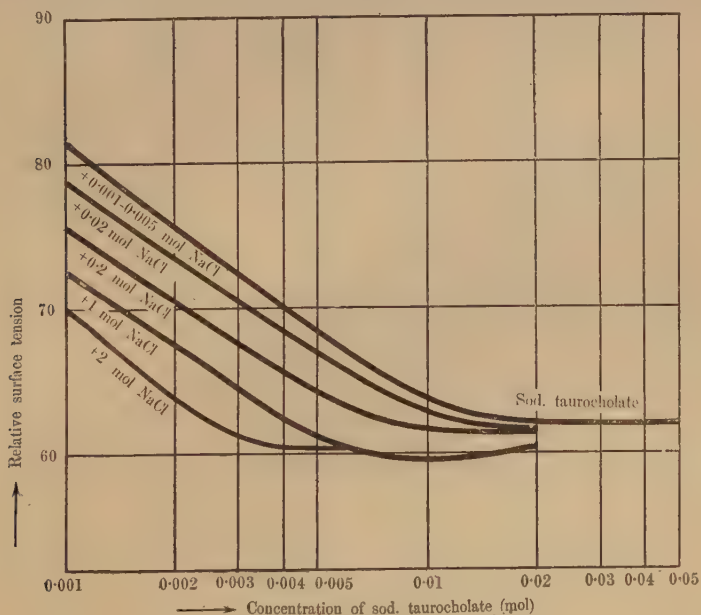


Fig. 2.

TABLE III.

Nature of salt	Concentration of salt	Concentration of sod. taurocholate (mol)				
		0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
LiCl	0	81.7	75.2	72.1	69.9	68.9
	0.001	81.2	75.1	71.9	70.1	69.0
	0.002	81.1	74.8	71.6	69.8	69.1
	0.005	80.6	74.5	71.5	70.2	68.2
	0.01	79.8	74.1	71.4	70.1	67.9
	0.02	79.3	73.7	71.2	69.6	68.3
	0.05	77.8	72.4	70.5	68.5	67.1
	0.1	76.8	7.13	69.4	67.6	66.2
	0.2	76.4	70.9	69.2	66.5	65.0
	0.5	75.5	70.5	67.3	64.6	63.5
	1.	74.2	68.6	65.9	63.0	61.3
	2.	72.3	67.1	63.9	60.8	60.2
	4.	70.6	66.7	64.4	61.3	61.3
	8.	68.0	66.3	65.7	65.1	64.9

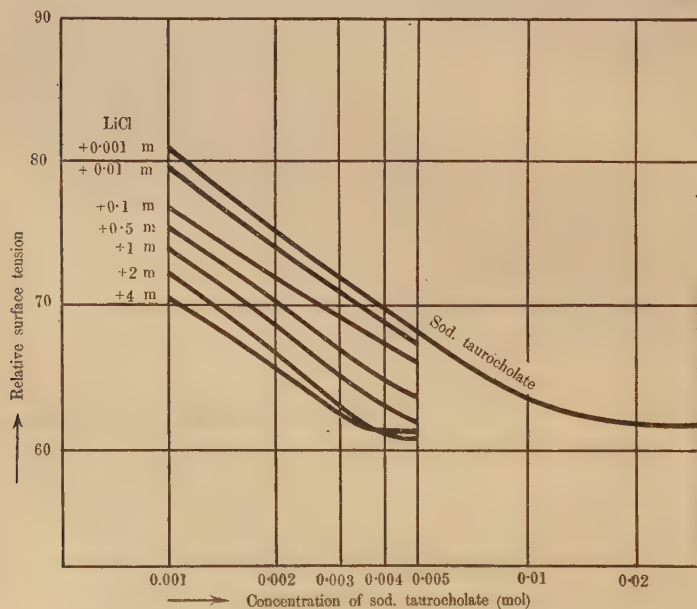


Fig. 3.

TABLE IV.

Nature of salt	Concentration of salt	Concentration of sod. taurocholate (mol)						
		0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.01	0.02
CaCl <sub>2</sub>	0	80.7	75.5	72.1	70.	68.8	63.5	61.8
	0.00001	81.7						
	0.00002	81.2						
	0.00005	80.9						
	0.0001	80.6						
	0.0002	80.4						
	0.0005	79.1						
	0.001	78.7	73.5	70.5	68.4	67.3		
	0.002	78.0	72.6	70.2	68.3	66.8		
	0.005	77.1	72.1	69.5	67.8	66.2	60.5	60.5
	0.01	76.5	72.0	69.2	67.5	65.8		
	0.02	76.3	71.0	68.2	66.7	64.1	58.2	58.6
	0.05	75.3	70.5	68.1	65.1	62.5		
	0.1	75.0	69.7	67.0	63.8	61.7		
	0.2	74.5	68.9	66.1	62.3	60.3	56.8	75.6
	0.5	73.5	67.9	64.5	61.1	59.8		
	1.	73.1	67.6	63.5	60.3	59.8	58.5	59.4
	2.	71.0	66.5	63.4	62.1	61.9		

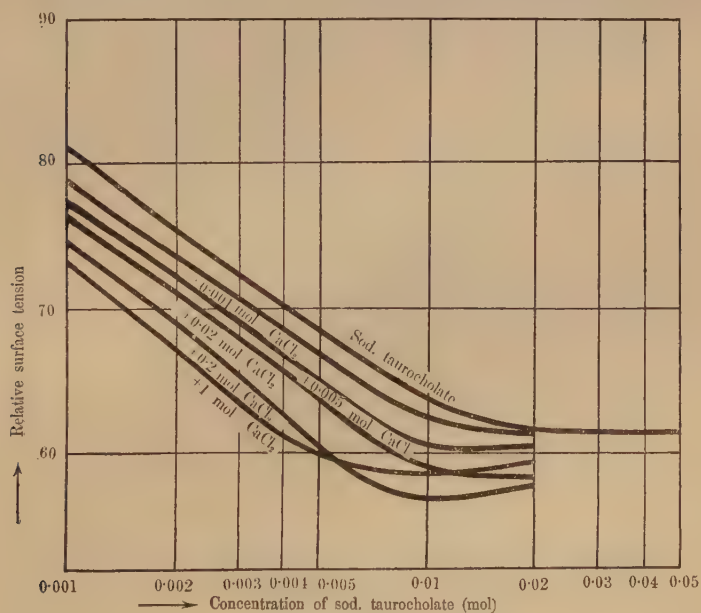


Fig. 4.

TABLE V.

Nature of salt	Concentration of salt	Concentration of sod. taurocholate (mol)				
		0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
MgCl <sub>2</sub>	0	81.8	75.5	72.0	70.1	68.7
	0.00001	81.2				
	0.00002	81.5				
	0.00005	80.7				
	0.0001	80.5				
	0.0002	80.2				
	0.0005	80.0				
	0.001	78.8	73.7	70.8	69.0	67.7
	0.002	78.0	73.0	70.3	68.5	67.1
	0.005	77.1	72.4	69.5	68.0	66.5
	0.01	76.5	72.1	69.1	67.8	65.9
	0.02	76.1	71.7	68.9	67.3	64.5
	0.05	75.2	71.2	68.0	65.3	62.6
	0.1	74.9	70.9	67.1	64.4	62.2
	0.2	74.5	70.4	66.1	63.5	61.7
	0.5	74.0	69.3	65.2	62.7	60.4
	1.0	73.5	68.1	63.8	61.1	60.3
	2.0	73.1	66.5	62.9	61.7	61.8

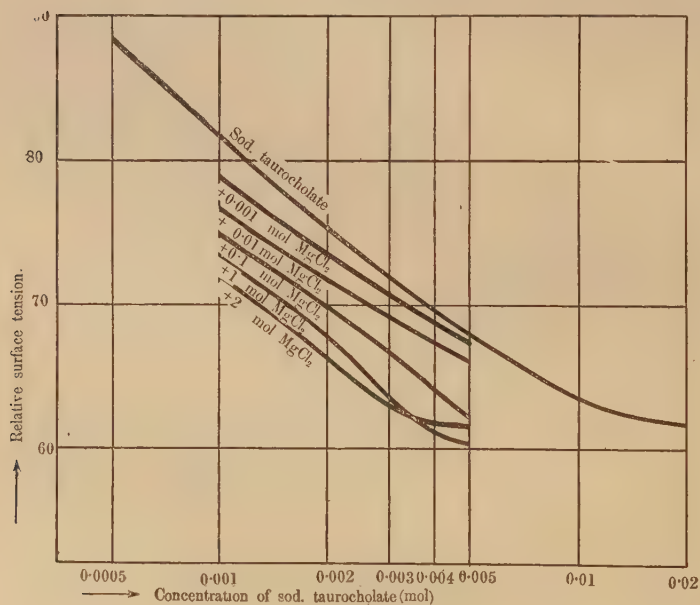


Fig. 5.

TABLE VI.

Nature of salt	Concentration of salt	Concentration of sod. taurocholate (mol)					
		0.0005	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0.00000	88.3	81.8	75.7	72.3	70.3	68.7
	0.001	88.3	81.6	75.4	72.3	70.2	68.8
	0.002	87.9	80.5	75.2	72.2	70.2	68.6
	0.005	86.3	80.3	78.9	71.8	70.0	68.4
	0.01	84.9	79.0	74.0	70.8	69.3	68.2
	0.02	83.6	78.2	72.9	70.2	68.5	66.8
	0.05	82.3	76.7	71.6	69.7	67.3	65.4
	0.1	81.1	75.7	71.0	68.8	65.4	64.6
	0.2	79.2	74.2	69.4	66.1	64.1	62.9
	0.5	77.7	71.8	65.9	63.8	62.7	61.8
	1.0	70.0	66.8	63.5	63.1	62.8	62.

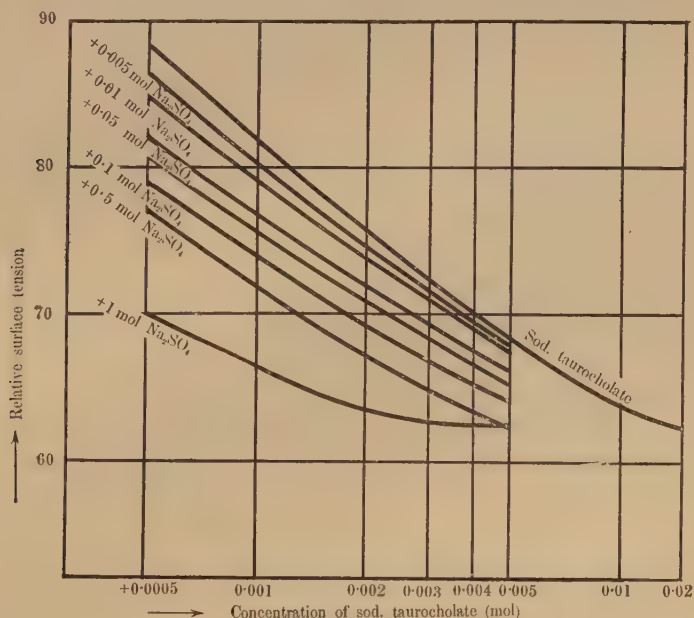


Fig. 6.

TABLE VII.

Nature of salt	Concentration of salt	Concentration of sod. taurocholate (mol)					
		0.0005	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
$\text{MgSO}_4$	0	89.1	81.8	75.4	72.3	70.3	68.7
	0.001	84.8	79.1	73.4	70.7	69.0	67.9
	0.002	84.2	78.5	73.1	70.3	68.8	67.7
	0.005	83.1	77.6	72.6	70.1	68.5	67.3
	0.01	82.8	77.2	72.0	69.7	68.0	67.0
	0.02	82.0	76.5	71.9	69.5	66.4	65.6
	0.05	81.2	76.2	71.6	69.0	66.0	63.7
	0.1	80.8	76.0	71.2	68.3	65.1	62.9
	0.2	80.0	75.2	70.3	66.9	64.6	62.6
	0.5	77.9	73.5	67.8	64.6	63.0	61.9
	1.0	73.8	69.3	65.7	63.0	62.4	62.0
	2.0	64.4	62.5	62.9	63.0	62.6	62.4

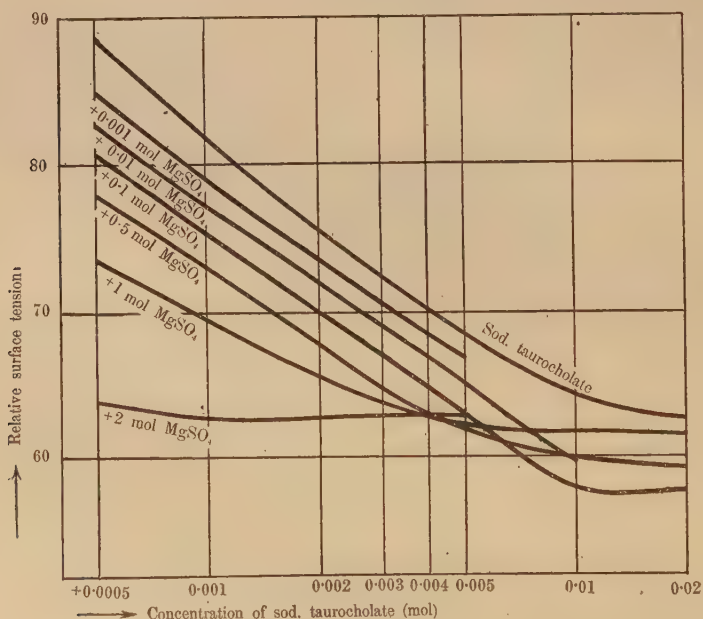


Fig. 7.

TABLE VIII.

Nature of salt	Concentration of salt	Concentration of sod. taurocholate (mol)						
		0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.01	0.02
CuSO	0	81.8	75.7	72.1	70.2	68.7	63.5	61.8
	0.001	77.2				64.9	58.5	53.6
	0.005	75.6				62.9	57.9	54.4
	0.02	74.2				61.1	55.9	54.5
	0.2	72.9				59.3	54.2	55.0

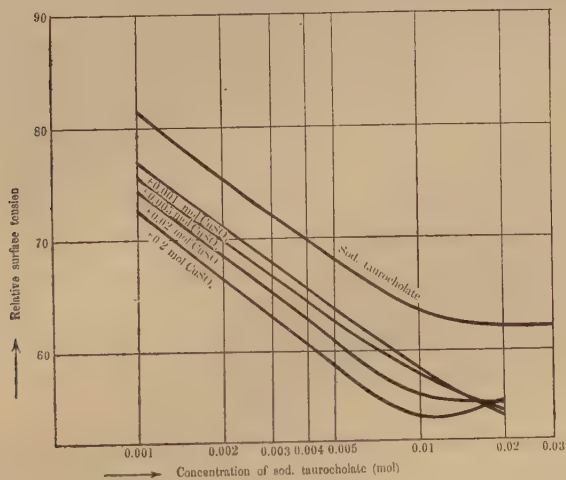


Fig. 8.

TABLE IX.

Nature of salt	Concentration of salt	Concentration of sod. taurocholate (mol)				
		0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
$\text{Al}_2(\text{SO})_3$	0	81.6	76.0	72.5	70.1	69.
	0.0005	72.5	70.1	68.5	67.3	66.2
	0.001	72.5	69.7	67.9	66.7	66.1
	0.002	72.5	69.6	67.6	66.5	66.0
	0.005	72.6	69.2	67.3	66.2	65.7
	0.01	72.8	69.1	67.1	65.7	64.9
	0.02	72.9	69.1	66.7	65.2	63.7
	0.05	72.7	68.7	66.2	63.7	61.9
	0.1	72.0				
	0.2	70.6				
	0.5	63.7				

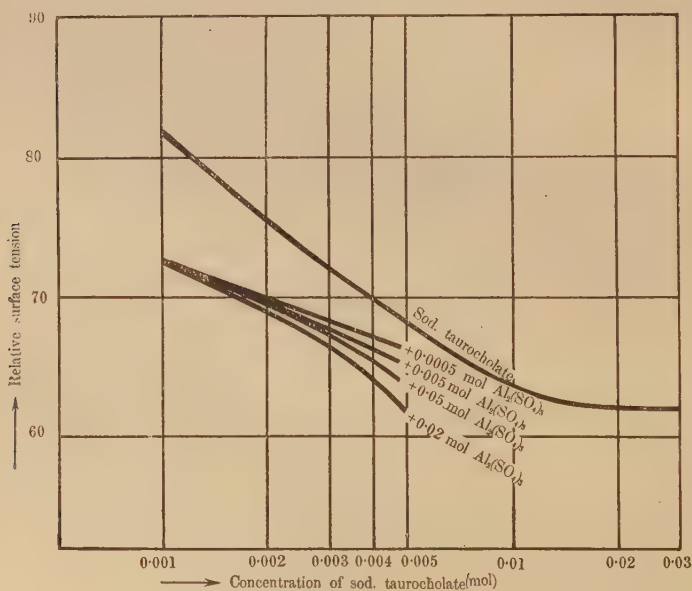


Fig. 9.

#### IV. THE EFFECT OF POLYVALENT CATION ON THE SURFACE TENSION OF SODIUM TAUROCHOLATE SOLUTION.

As stated under sections II and III, the addition of various electrolytes to the not too much concentrated sodium taurocholate solution lowers the surface tension of the latter, and the amount of the lowering can be understood as due to the hydration of the added electrolyte. It is, however, also shown that many electrolytes with polyvalent cation lower the surface tension of the solution much more than that of electrolyte with monovalent cation. These relations can be easily seen in figure 2-9.

In the case of every concentration of taurocholate solution, the surface tension is, on the addition of small amounts of calcium chloride, magnesium sulphate, copper sulphate and aluminium sulphate much more lowered than in pure sodium taurocholate solution, while on the addition of equivalent amount of sodium chloride or sodium sulphate there is hardly observable any difference in surface tension from that in the pure sodium taurocholate solution.

The nature of this lowering of surface tension upon the addition of polyvalent cation may be considered as due to any one of the following three factors. These are: 1. The added electrolytes, being highly hydrated, may deprive water of the solution and render the concentration of taurocholate higher and make the solution more surface active; 2. The added cation may combine with taurocholate ion to a less soluble compound, and the less soluble compound which tends to separate out of the solution may exhibit much more activity than a soluble substance; 3. The added cation forms a salt with taurocholate ion, which is less dissociated than sodium taurocholate, and this increase of the unionised molecules is followed by the lowering of surface tension. When the salt formed is more active than the original salt (sodium salt) the lowering may be highly noticeable. The evaluation of these three possibilities is tried as follows.

### 1. *Hydration of the added electrolytes.*

As is shown in the above mentioned table I, the effect of hydration of the added electrolytes is really great. We can, however, neglect this effect in our consideration as we confine ourselves for the moment only to the study of the difference of the effect of electrolytes in their quite dilute solutions (0.0001 mol), where the hydrated water does not amount to much. There is really a manifest difference observable in the lowering effect on surface tension between calcium or copper salt on the one hand and sodium salt on the other, already at the concentration 1:10000. That there is no effect of hydration of these salts at the concentrations mentioned is shown by the experiment on the influence of these salts at 1:1000 concentration on the surface tension of urethan, where the surface tension of the latter is not changed at all by the addition of any of these salts at the concentration 1:1000.

### 2. *The formation of an insoluble compound.*

As a less soluble substance tend to separate out of the solution more easily than a soluble substance, it can accumulate on the surface and may reduce the surface tension of the solution more readily than the soluble substance. To test how much this relation holds in our cases we compared the surface tension of taurocholate solution by the addition of either silver nitrate or copper sulphate. Silver nitrate forms with sodium taurocholate insoluble silver taurocholate, while copper taurocholate is quite soluble in water. When we add silver nitrate in an amount of 0.001 mol to the 0.001 N. sodium taurocholate solution, only a faint turbidity appears as time goes on and the whole remains in solution for a long time. As we increase the amount of added silver nitrate, the turbidity increases, but the precipitation does not occur. When, however, we use about five times its amount of silver nitrate the precipitation of silver taurocholate is obtained, which remains entirely insoluble in water. On the other hand we obtain no

precipitation of copper taurocholate, though we added a great amount of copper sulphate to sodium taurocholate solution.

As our table indicates, silver nitrate does in every concentration no more reduce the surface tension of taurocholate solution as sodium chloride does, while the effect of copper sulphate is very intense. This shows that the insolubility of taurocholate salt is not the main reason in this case. The easily soluble copper salt lowers the surface tension quite readily while the less soluble silver salt remains less effective.

### 3. *The formation of less dissociable salt.*

From the consideration mentioned in the two preceding sections there remains only the third possibility of our assumption: the formation of less dissociable salt in the case of polyvalent cation. I have, therefore, compared the dissociation degree of sodium, calcium and copper taurocholate. These salts were made myself from the pure taurocholic acid free from cholic acid. The purity of these compounds was checked by the determination of percentage composition of sulphur and nitrogen in them.

0.001 N of each of these solutions was made and the conductivity was determined at 18°.

TABLE X.

concentration	$\kappa$	$\mu - (\mu \text{ aq})$
0.001	0.00006119	60.30
0.002	0.0001206	59.20
0.005	0.0002865	57.09
0.01	0.0005531	55.00

To calculate the degree of dissociation it is necessary to know the value of equivalent conductivity of taurocholate ion. As, how-

ever, there is no report of this value in literature, I determined it by the method of Kohlrausch, measuring the conductivity of pure sodium taurocholate solution at various dilutions and applying the relation between conductivity and  $\sqrt{C}$  for the extrapolation of the conductivity at infinite dilution.

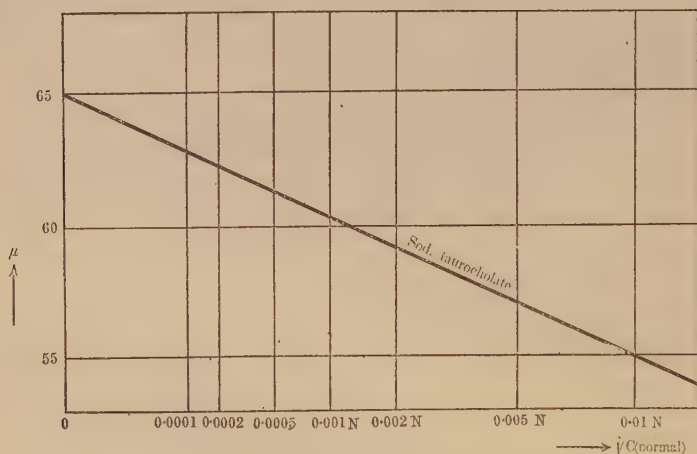


Fig. 10.

From this result, the equivalent conductivity of sodium taurocholate can be taken as 65, and consequently that of taurocholate ion as 21.4. Assuming the equivalent conductivity of sodium, calcium and copper as 43.6, 53.0 and 46.0 respectively, we can calculate the equivalent conductivities of taurocholate of these metals, as is shown in table XI. We now know that while sodium taurocholate is dissociated to 92.6% at the dilution 1:1000, calcium salt is dissociated only to 83.4 and the dissociation degree of copper salt is far less (67.4%).

From these results it seems to be quite reasonable to suppose that polyvalent cations reduce the surface tension of sodium taurocholate solution by forming less dissociable salts.

TABLE XI.

The conductivity and dissociation degree of sodium, calcium and copper taurocholate.

Salt	$\mu$ 18°	$\mu_{\infty}$ 18°	$\frac{\mu}{\mu_{\infty}}$
Sodium taurocholate	60.2	65.0	0.926
Calcium taurocholate	62.0	74.4	0.834
Copper taurocholate	45.1	67.4	0.674

V. THE EFFECT OF THE ADDITION OF HYDROCHLORIC ACID OR  
SODIUM HYDROXIDE ON THE SURFACE TENSION OF  
TAUROCHOLATE ACID.

As is postulated by Itoi the taurocholic acid, being relatively strong electrolyte and being dissociated in its watery solution, is adsorbed only partly on the surface of its solution. If the surface tension of a taurocholic acid solution is not fully effective, it can therefore be reduced more by adding hydrochloric acid, because the latter depresses the dissociation of taurocholic acid. Also, I have followed the change of surface tension of taurocholic acid solution on the addition of hydrochloric acid and also of sodium hydroxide, the result being given in table XII.

As is seen in the table and figure, the addition of hydrochloric acid suppresses the dissociation of taurocholic acid and so reduces the surface tension of the latter solution. The addition of sodium hydroxide, reducing the amount of free taurocholic acid, naturally increases the surface tension of the solution. But the equivalent quantity of sodium hydroxide is not sufficient to suppress the presence of free taurocholic acid, owing to the hydrolysis of the salts and the further addition of sodium hydroxide effects a further increase of the surface tension. When the concentration of sodium hydroxide in the solution increases more and more, however, the

TABLE XII.

Surface tension of taurocholic acid (0.005 N).

HCl		NaOH	
0	78.2	0	78.2
0.001	77.8	0.001	78.2
0.0002	77.8	0.0002	78.3
0.0005	78.0	0.0005	78.6
0.001	78.0	0.001	78.9
0.002	77.7	0.002	79.2
0.005	77.1	0.005	79.6
1.01	76.3	0.01	80.2
0.02	75.6	0.02	78.6
0.05	73.5	0.05	76.0
0.1	72.3	0.1	74.0

dissociation of sodium taurocholate is suppressed and the reduction of surface tension becomes observable and the surface activity increases with the increase of sodium hydroxide added.

#### VI. THE COMPARISON OF SURFACE ACTIVITY BETWEEN SODIUM AND COPPER TAUROCHOLATE SOLUTION.

In section IV of this paper, it was stated that calcium and copper ions, added to sodium taurocholate solution, decrease the surface tension of the latter even by a really small amount of the salt, and is explained by the formation of less dissociated salt, as could be shown in the difference of conductivity of their solutions.

We have seen also, in section III 2, that when salt with cation of different valencies is added in an increasing amount to sodium taurocholate solution of various concentrations, the surface activity increases with the concentrations of taurocholate, tending, however, to a constant value, which differs according to the nature of added electrolytes. Because of curiosity to know about the surface activity of these taurocholate solutions alone, free from the effect

of added or formed electrolytes as in cases described under section III 2, sodium, calcium and copper taurocholate were prepared and the surface activities of solution of these salts at varying concentrations were determined. The results are shown in table XIII and Figure 11.

TABLE XIII.

Concentration (mol)	Relative surface tension		
	Sodium taurocholate	Calcium taurocholate	Copper taurocholate
0.0001	100.0	98.7	—
0.0002	99.4	96.3	—
0.0005	96.7	90.1	—
0.001	92.6	84.7	80.9
0.002	86.7	78.5	75.0
0.005	78.8	70.9	67.6
0.01	73.9	67.4	64.5
0.02	71.8	66.6	63.6
0.05	70.6	65.4	62.8
0.1	70.4	65.2	62.8

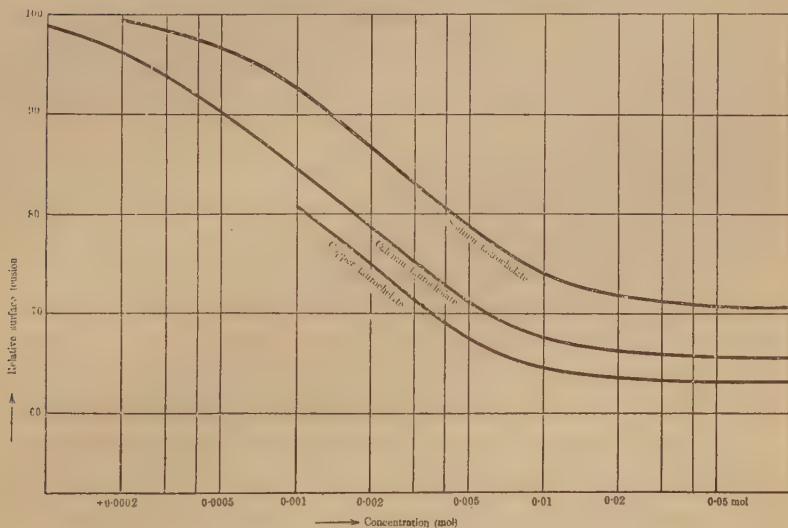


Fig. 11.

As can be seen in the table and the figure, each of sodium, calcium and copper taurocholate, from a certain concentration on, attains a minimum surface tension, differing from each other. Among these three cases examined copper taurocholate is most active, succeeded by calcium taurocholate, while sodium taurocholate is least active. These results clearly show to us the fact that these three taurocholates have surface activities of their own.

Tensiometric measurement of these salts at 0.02 mol. solution, which is due to the kindness of Dr. Usawa, gave also values qualitatively corresponding to our stalagmometric results, as is shown in the following:

Kind of salt	Concentrate	Relative surface tension (Stalagmometric method)
Sodium taurocholate	0.02	72.0
Calcium taurocholate	0.02	61.3
Copper taurocholate	0.02	60.7

#### SUMMARY.

1. Various salts, when added to the sodium taurocholate solution, lower the surface tension of the latter differently according to their nature.

2. The influence of the salt in higher concentration can be interpreted as the result of hydration of the salts, while the effect at much lower concentration is related to the nature of cations.

3. Cations which form a less dissociable taurocholate salt are found more effective in lowering the surface tension of sodium taurocholate solution.

4. Surface tension of taurocholic acid and its salt is caused by the accumulation of them as molecules on the surface of solution.

5. The solutions of sodium, calcium and copper taurocholate show a minimum surface tension of their own, differing from each other. This indicates the fact that the surface activity of the surface film of various taurocholates have different values.

REFERENCE.

Itoi, M. (1930): J. of Biochem., **12**, 83.



## MICROCHEMICAL STUDY OF HEMICELLULOSE IN SOME PLANT CELLS, WITH SPECIAL REFERENCE TO ITS DISTRIBUTION IN THE PROTO-PLASM.

By

R. C. MALHOTRA.

*(From the Hull Botanical Laboratory, University of Chicago,  
Chicago Ill., U.S.A.)*

(Received for publication, August 19, 1930)

### INTRODUCTION.

When sugars and starch are removed by various Macro or Micro chemical methods from plant tissues, particularly wood, there usually remains a residue. Some part of this residue can be hydrolyzed by dilute mineral acids to monosaccharides. This acid hydrolyzable carbohydrate is designated as "Hemicellulose (Haas and Hill, Mathews, Plimmer). Many text books on micro-chemistry, (Molisch, Poulson, Grafe), cytology (Sharp) and histology (Ballard) have noted that in plants, hemicellulose occurs only in the walls, particularly in wood, seed coats and endosperms and in fungi (Eckerson); yet very recently Murneek (1929) and Sharp (1926) Clements (1929) have suggested, that hemicellulose may be used as a reserve material. If that is true, one would look upon hemicellulose as an important chemical constituent in plant economy, with particular reference to winter injury of the plants of Northern latitude. It is needless to say that the United States Department of Agriculture reports a huge financial loss due to this type of injury.

If hemicellulose is a reserve material, it may be that through enzymatic action, it can be available to the plant as suggested by some authors. However, it is shown, that if it occurs only in the cell wall, the molecule is always in combination with cellulose, pectin and in some cases with lignin (Candlin and Schryver, Ehrlich,

O'Dwyer 1923). In this state (a) it cannot be readily available and consequently the amount of hemicellulose can not fluctuate. Yet data presented by Harvey (1923) Roberts (1926), Schellenberg (1905), Murneek (1928) have shown seasonal fluctuation in the hemicellulose content over a period of one year. (b) If it is removed from cell walls, the cell walls become so thin and weak that there may be danger of a cell being torn apart and may thus threaten the life of the cell or tissue concerned. Furthermore very little is known about the exact nature of hemicellulose as it occurs in the cell wall. On the other hand, if hemicellulose is present, both in the protoplasm as well as in the cell wall, its seasonal fluctuation and thus functioning as a reserve material is clearly evident. It was with this intention that the present study was undertaken. It is hoped, that the location of hemicellulose in cell by micro-chemical methods will be helpful to plant Biochemists and plant physiologists as well as cytologists. It is needless to say that there is a great heterogeneity of various hemicellulose substances as well as scarcity of knowledge concerning them.

#### HISTORICAL REVIEW.

Reiss (1889) after extensive observations and careful chemical studies, came to the conclusion, that liable cellular thickening is not a true cellulose. He designated it as "amyloid" or "reserve cellulose" which was called "hemi-cellulose" by Schulze (1891) two years later. Harvey (1923) has shown that of the total polysaccharides in apple shoots, by far the greatest fraction is made up of pentoses, thus indicating that hemicelluloses are primarily pentosans, as was suggested by Spoehr (1919).

Thaysen and Bunker (1927) think that hemicellulose is probably more common in plant tissues than cellulose, but is less thoroughly investigated. Many authors (Mitchell) have pointed out that there is a considerable variation in the properties of hemicelluloses obtained from different sources. Differences of opinion result from the number of hemicelluloses studied and of the methods

of study used. The microchemical methods consist of hydrolyzing the tissues with dilute acids or, more commonly of extracting tissue with one to five percent, alkali and testing the alcoholic precipitate from the extract. This precipitate is called hemicellulose and its properties are considered to be identical with those of hemicellulose regardless of the fact that the tissue from which the extract was obtained may contain non-hemicellulose compounds such as pectic compounds, soluble in dilute alkali and capable of precipitation by alcohol.

#### METHODS USED IN MICROCHEMICAL STUDY OF HEMICELLULOSE.

It may be worth while to consider some important microchemical methods used in the study of hemicellulose. Gibson (1893) considered carbohydrate substances of membranes which did not color blue with chlorzinc iodid as hemicelluloses. Tunmann (1913) included all unsuberized, non-lignified walls which are hydrolized by dilute acids as hemicelluloses. Molisch (1913) says that hemicellulose gives hydrocellulose with 1% HCl or becomes colored directly blue with iodine. Czapek (1913) and his group consider classing pectic substances as hemicelluloses. Mangin (1988), O'Dwyer (1926) speaks of Hemicelluloses as related to the pectic substances. Van Wisselingh's (1925) brief summary may be referred to for further details.

#### EXPERIMENTAL.

##### *A. Material and preparation of tissues for Microchemical tests.*

One year old twigs of apple (McIntosh and Winter Banana varieties) as well as tomato seeds from a single plant were secured. From these seeds, tomato plants were grown for 7 months in a green house at the University of Chicago. Half of the plants were grown at 80° and the other half at 50°. This was necessary since the former temperature produces non-hardened plants while the

latter produces hardened ones as brought out by Rosa (1921). It was assumed that if hardness is due to hemicellulose as advocated by Murneek (1929) there may not only be a difference in the quantity present but that there may be a difference in the location of hemicellulose also.

Pieces were secured from the twigs of the same age and the same length. The tomato sections were cut 10, 15, 20 microns thick and apple 15, 20, 25 microns thick on a freezing microtome. Uniformity of thickness insured more nearly comparable results, since in such thin sections almost all cells were cut, while in thick sections some were uncut, thus retaining cell contents. It was realized that this procedure would allow easy removal of cell contents by washing and would also allow various reagents to react with every layer of the cell wall, thus would exclude errors arising from differences in permeability in case of thin sections; while cell contents could be more accurately studied in thick sections. Before making tests, chloral hydrate in water (5:2) was used as a cleaning agent. It has been shown by Mitchell (1930) in case of Iris endosperm, that chloral hydrate previous to microchemical analysis, does not interfere with the production of sugar from the walls after they are thoroughly washed with water. She further found that, in general, chloral hydrate used as a previous treatment hastens the reaction of the other reagents. About 50 sections of each kind were used.

#### *B. Choice of the reagent.*

The writer, first used most reagents recommended for the microchemical study of hemicellulose in plant tissues. He found that Schulze's reagent (concentrated potassium chlorate solution and concentrated nitric acid 1:1) is most satisfactory for the microscopic study of hemicellulose, because cellulose is insoluble in this reagent while hemicellulose is soluble. While the writer was writing up the experiment, Miss Mitchell's (1930) study was brought to the writer's notice. In all essentials, her conclusions with regard to



Cross sections of apple and tomato showing the areas where cells were selected for the micro chemical study of hemicellulose; circles indicate the areas used.

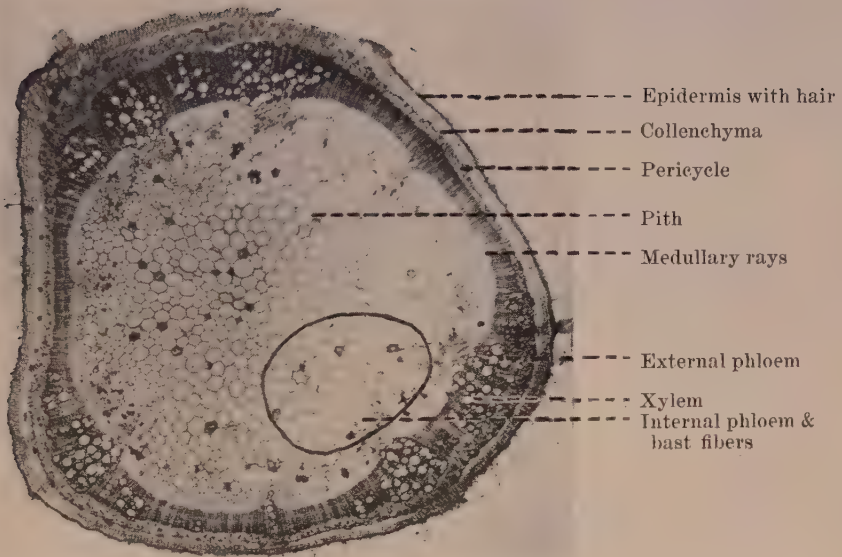
latter produces hardened ones as brought out by Ross (1921). It was assumed that if hardiness is due to hemicellulose, as indicated by Munrook (1923), there may not only be a difference in the quantity present but that there may be a difference in the location of hemicellulose also.

Planes were prepared from cross sections of *Pinus strobus* and *Pinus taeda* of the same length as the microtome sections, but in the latter case the planes were made and applied to the tissue as described in a special microtome. The purpose of this was to produce more nearly comparable results, since in such thin sections almost all cells were cut wall to thick sections some were intact and some empty cell contents. It was realized that this method would allow easy removal of cell contents in sections and would also allow various reagents to react with every layer of the cell wall, thus would exclude cases arising from differences in permeability in case of thin sections, when end contents could be more readily applied in thick sections. Before making tests, chloral hydrate (1:20) was used as a clearing agent. It has been shown by Mahaffey (1930) in case of Iris that chloral hydrate produces no interference with analysis, does not interfere with the production of sugar from the walls and does not interfere with washing with water. The results showed that, in general, chloral hydrate used as a previous treatment of the tissue does not interfere with the analysis. All of the reagents of each kind were used.

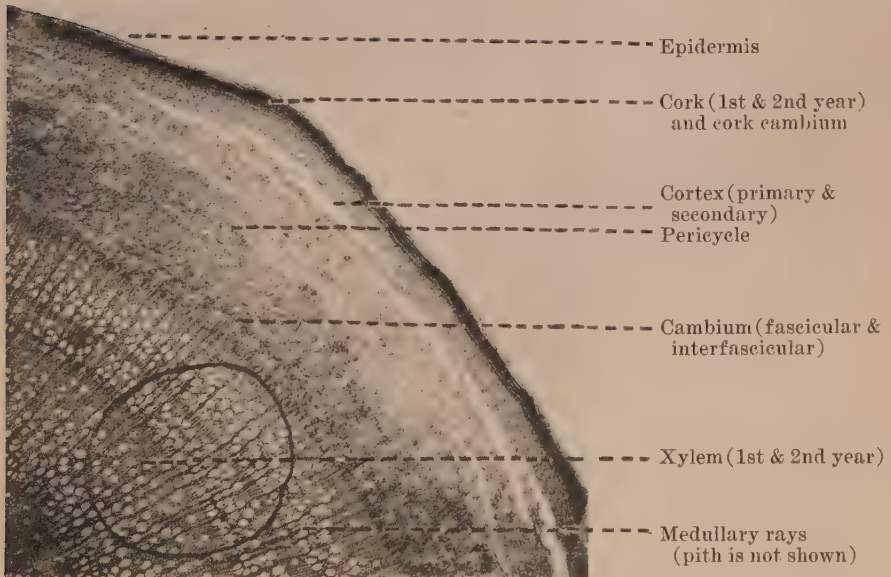
### B. Choice of the reagent.

The writer first used most reagents recommended for the microchemical study of hemicellulose in plant tissues. He found that *borax* (1:10) solution, *potassium alkoxide* solution and *ammonium molybdate* (1:10) were most satisfactory for the microscopic study of hemicellulose in tissues. These are soluble in this reagent. Hemicellulose is soluble. While the writer was working up the experience, Dr. Milton H. (1930) study was brought to the writer's attention. In his studies, his conclusions with regard to

PLATE I.



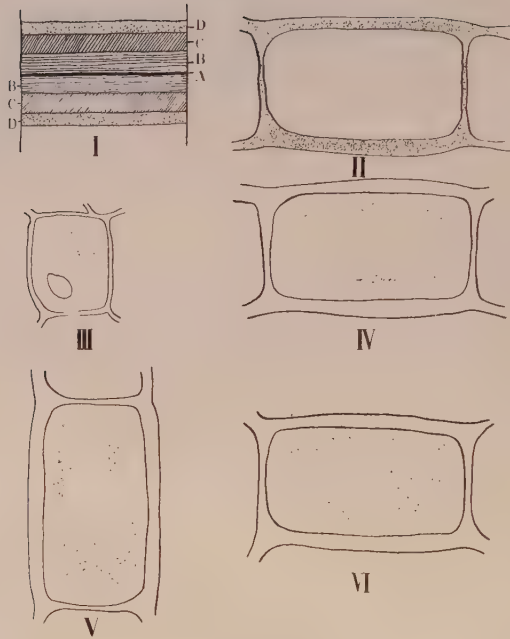
Tomato stem.



Apple shoot.

Cross sections of apple and tomato showing the areas where cells were selected for the micro chemical study of hemicellulose; circles indicate the area used.

PLATE II.



- I. A cell wall of matured apple cells showing layers. A. middle Lamella (Pectin), B. Secondary layer (some lignin, mostly cellulose and some hemicellulose), C. Cellulose layers impregnated with hemicellulose, D. Mostly hemicellulose layer. Note the relative width of each layer.
- II. Tomato cell cut very thin. Only the wall gave hemicellulose reaction. Probably most of the protoplasmic contents have escaped due to thin sectioning.
- III. Thick section of a young apple cell. Note the location of hemicellulose in the protoplasm as indicated by dots. Hemicellulose of the cell wall is not shown. Outline of nucleus is also indicated.
- IV. Thick section of a matured apple cell. Note the distribution of hemicellulose throughout the protoplasm as well as the total quantity in both kind of cells. The same phenomenon was noted in tomato cells, which are not shown.
- V. Tomato cells from a stem grown at 50°. Note the increase in hemicellulose in protoplasm.
- VI. Tomato cell from a stem grown at 80°. Note the decrease in hemicellulose in protoplasm.

this reagent are the same as mine, contradictory to Schulze and Tollen's (1892) claim that hemicelluloses are insoluble in Schulze's reagent. Since she has very ably discussed the merits of other reagents used for hemicellulose, the writer does not wish to repeat the result, gained from these reagents. The writer's results do not seem to agree with the above author, only with one reagent, namely when she used 2-5% HCl heated at 80°C for one and one half hours, followed by 2% KOH, as recommended by Eckerson. She found that by this treatment, hemicellulose and pectic materials cannot be distinguished in seeds. However the writer found that 1% HCl heated at 50°C for 3 hours followed by 1% KOH will segregate between these two chemically distinguished materials. Of course Miss Mitchell used seeds in her studies, while the writer used twigs. It may be that the nature of hemicellulose from these sources is so different that in one case there is a response to these reagents while in the other there is not.

#### DISCUSSION AND RESULTS.

Plate I shows the location of the cells in cross-section, which were tested for hemicellulose. It was found in thin sections, that only cell walls gave evidence of the presence of hemicellulose, while in thick sections, isolated areas in the protoplasm also gave hemicellulose reaction. It was previously realized that in thin sections, cell content may escape by washing and other operations, while in thick sections, although water and reagents were permeable, cell contents probably did not escape, at least very little if any, and even that was not noticeable. It was also found upon the microscopic examination of many sections, that the younger cells both of apple twigs and tomato plants contained at one spot only, a larger amount of hemicellulose in protoplasm than in the older cells, while in regard to the presence of the hemicellulose in the cell walls, there was not a great deal of difference between both kinds of wall; although there seemed to be some difference in older cells, distribution of hemicellulose in the protoplasm was all over the surface, in

favor of matured cells. If protoplasmic hemicellulose be considered comparatively freer than that of the walls in its use of a reserve material, as a number of workers have pointed out, it would seem in accordance with this work that comparatively younger and active cells have less reserve hemicellulose than the older ones. It has been pointed out by Chandler (1925) and Hooker (1920) that tender twigs consisting of small and immatured cells are more susceptible to winter and drought injuries than the similar old twigs composed of matured cells. If the presence of reserve hemicellulose material exerts some influence on these tissues against such injuries as Murneek (1929) claims, then the older cells which can stand higher fluctuations of temperature as well as desiccation, should have more reserve material. This was found to be exactly true in accordance with the results of this study.

Rosa (1921), Harvey (1929, 30), Howard (1915) and others have pointed out that by holding plants in cold temperature, hardiness can be brought out. Thus the plant can stand lower temperatures than would be possible if grown at higher temperatures. Rosa has noted pentosan increase during this environmental change while Murneek's data, based on chemical analysis, points to the increase of hemicellulose content. On microscopic examination, many sections taken from identical tomato twigs (plants grown from the seeds of the same parent) at 50° and 80° showed that there was more hemicellulose in the protoplasm of cells grown in 50° than in 80°. This study could not show, however, whether the decrease of hemicellulose in the case of cells from plants grown at higher temperature was due to higher respiration as recorded by Palladin (1926), thus consuming a major portion of these materials, or due to greater hydrolysis of hemicellulose in accordance with Vant Hoff's (1924), or to the slower synthesis of carbohydrates at lower temperature as demonstrated by Maximov (1929). There are some experiments under way which may explain these differences in the future. Plate II shows several types of cells cut in cross section from tomato plants and apple

twigs. The presence of hemicellulose as pointed out in the discussion is evident. It is needless to say that the cell drawn is digrammatic.

#### SUMMARY.

1. It has been pointed out by many workers from different fields that hemicellulose is present only in cell walls impregnated in cellulose, pectin or lignin.

2. Within recent years, the importance of hemicellulose has been brought out in the plant economy with reference to cold and desiccation. A suggestion has been made that this material may act as reserve carbohydrate.

3. Microscopical study reported in this paper, points out that this material is not only present in plant cells as cell wall material but also as protoplasmic inclusion. In this state it is freer and can be easily used than if it occurs only in the wall.

4. Hemicellulose tests on tomato cells grown in warm and cold temperatures seem to show that there is more hemicellulose present in cells from plants grown at cold temperature, than in those grown at warm temperature. At the present time explanations for this difference is lacking.

5. Merits of various microchemical methods, used for hemicellulose have been pointed out.

It is a pleasure to make acknowledgment to Dr. A. C. Noé, Professor of Paleo-Botany and Geology, at the University of Chicago for the preparation of micro-photographs used in this paper. The writer records his appreciation to his friend, Mr. H. B. Turkey, Chief Horticulturist, New York State Agricultural Experimental Station, Geneva, New York, for the supply of apple shoots for the study of the mechanism of winter injury to fruit trees, of which this is a minor tissue.

#### LITERATURE CITED.

- Ballard, C. W.: *Elements of vegetable histology*. Chapman & Hall (1929)  
New York.

- Bayliss, W. M.: Principles of general physiology. 4th Ed. Longmans Green & Co. London. (1924).
- Candlin, E. J. and Schryver, S. B. (1928): Proc. Royal Soc. (London) **103**, 365.
- Chandler, W. H.: Fruit Growing. Houghton Mifflin Co. N.Y. (1925).
- Clements, H. F.: Ph D. Thesis. University of Chicago. Unpublished (1929).
- Czapek, F. (1913): Biochemie der Pflanzen. 2nd Ed., **1**, 554.
- Eckerson, S. H.: Microchemistry (Laboratory outlines).
- Ehrlich, F. (1927): Zeitschr. Ang. Chem., **40**, 1305.
- Gilson, E. (1893): Cellule, **9**, 395.
- Grafe, V. (1911): Hemicellulosen Biochemisches Handlexikon., **2**.
- Haas, P. and Hill, T. G. (1929): An introduction to the chemistry of plant products. Longmans Green & Co. London, **1**.
- Harvey, E. M. (1923): Oregon Agr. Exp. Station. Bul. 200.
- Harvey, R. B. (1929-30): Proc. Amer. Soc. Plant Physiologists. Des. Moines Meeting Dec. also Journal of Forestry **28**, 50.
- Hooker, Jr. H. D. (1920): Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bul., **40**.
- Howard, W. L. (1915): Missouri Res. Bul., **21**.
- Mangin, L. (1888): Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, **107**, 144.
- Mathews, A. P.: Physiological Chemistry. 4th Ed. W. Wood & Co., New York (1927).
- Maximov, N. A.: The plant in relation to water. Trans. by R. H. Yapp. The Macmillan Co. (1929).
- Mitchell, E. M. (1930): Amer. Jour. Bot., **17**, 117.
- Molisch, H.: Mikrochemie der pflanze. 3rd Ed. Jena (1913).
- Murneek, A. E. (1928): Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull., **119**.
- „ (1929): Plant Physi., **4**, 251.
- O'Dwyer, M. H. (1923): Biochem. Journ., **17**, 501.
- „ (1926): Biochem. Journ., **20**, 656.
- Palladin, V. I.: Plant physiology 6th Russian Ed. trans. by B. E. Livingston. P. Blakiston's Son. Philadelphia (1926).
- Plimmer, R. H. A.: Practical organic and biochemistry. New Ed. Longmans Green & Co. London. (1926).
- Poulsen, V. A.: Botanical microchemistry. Boston. (1884).
- Reiss, R. (1889): Landw. Jahrb., **18**, 711.
- Roberts, R. H. (1926): Wisconsin Agr. Exp. Sta. Res. Bull., **68**.
- Rosa, J. T. Jr. (1921): Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull., **48**.
- Schellenberg, H. C. (1905): Ber. deutsch. Bot. Ges., **23**, 36.
- Schulze, C. and Tollens, B. (1892): Landw. Versuchsstat, **40**, 379.
- Schulze, E. (1891): Ber. deutsch. Chem. Ges., **24**, 2277.
- Sharp, L. W. (1926): An introduction to Cytology, McGraw-Hill Book

Co., 137.

Spoehr, H. A. (1919): The carbohydrate economy of Cacti. Carnegie Inst. Washington Publ., 287.

Thaysen, A. C. and Bunker, H. J.: The microbiology of cellulose, hemicellulose, pectin and gums. Oxford Univ. Press. (1927).

Tunman, O.: Pflanzen-mikrochemie. Berlin. (1913).

Van Wisselingh, C.: Handbuch der Pflanzen anatomie. Die Zellmembran. Berlin. (1925).



## ON THE DEGREE OF OXIDATION GOING ON WITHIN THE ANIMAL BODY UNDER SEVERAL CONDITIONS.

By

HITOSHI KIMURA.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.  
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, September 8, 1930.)

### I. INTRODUCTORY.

The mode of oxidation in an animal body can be considered from two points of view, quantitative and qualitative. The quantitative side can be determined by means of a calorimeter, or can be judged by the measurement of the amount of oxygen consumed during a certain period with the limitation that the oxidation follows under normal conditions. The qualitative side of oxidation going on within the animal body can be traced only indirectly by the chemical examination of urine and inspired and expired air. Under normal conditions fat and carbohydrate are oxidized almost completely and the metabolic products of nitrogenous bodies do not vary much, so that the amount of nitrogen in urine and that of oxygen uptake in the lungs can show the amount and the ratio of stuffs consumed in an animal body. In pathological conditions, however, the oxidation within the body is not complete and several unoxidised materials are excreted in urine, so that the mere measurement of nitrogen excreted and of oxygen consumed can not show much about the oxydative process going on in the animal body. If we could estimate the amount of all of the urine constituents separately it would be not so hard to guess about the degree of oxydation. But this determination of urine constituents is quite a tedious task and an almost impossible matter. Rubner

(1885) tried to know the degree of oxidation by examining the amount of C and N excreted in urine. If there were less oxidized substances than carbonate and urea excreted in a larger amount than normally the content of C in urine would become much larger in comparison with the amount of nitrogen. He called this ratio C:N as "Kohlenstoffquotient." Bickel (1925) examined this "Kohlenstoffquotient" in urines excreted under different conditions and called the cases where this value is very much increased above normal, indicating the lessened oxidation, "Dysoxydative Carbonurie". That this "Kohlenstoffquotient" shows the main degree of oxidation in the body is, however, only partially true. For instance, if we take adenine and uric acid, as noticed by Müller (1927), "Kohlenstoffquotient" is smaller in adenine than in uric acid, while adenine is a less oxidised substance than uric acid which constitutes the final oxidation product of purine body in the body. This example, to which many others can be added, shows that it is not quite safe to judge about the state of oxidation degree within the body by this value. Müller worked out some years ago the determination of Vakats  $O_2$  of urine, which indicates the amount of oxygen necessary to oxidize the material completely. By this method the main nitrogenous constituent of urine — urea — has the value Vakats  $O_2 = 0$ , being decomposed into carbon dioxide and Ammonia. As much urine nitrogen is excreted in organic form other than urea, Vakats  $O_2$  is accordingly increased. These circumstances seem to favor the Vakats  $O_2$  method for judging the oxidation condition in the animal body. I have therefore used this method in the study of oxidation condition in an animal body under different conditions, the result of which will be given in this paper. At first some modifications which seem to be necessary to get a better result are given.

## II. SOME MODIFICATIONS OF MÜLLER'S METHOD.

The principle of the Müller method consists in oxidizing the material with a certain amount of potassium iodate in the presence

of concentrated sulfuric acid in an Erlenmeyer conical flask made of hard glass at about  $200^{\circ}$  until the brown iodine vapour ceases to develop. An aliquot part is then used for the determination of nitrogen after Kjeldahl's method while to another portion is added potassium iodide, which decomposes the remaining iodate and frees the corresponding amount of iodine. The latter is titrated with 1/10 N thiosulfate solution. Vakut  $O_2$  is calculated as follows:

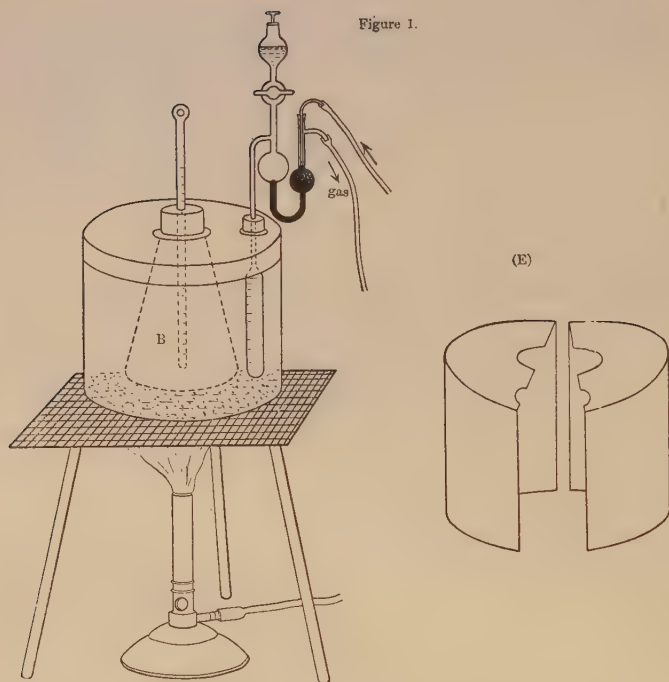
$$\text{Vakut } O_2 = \frac{(\text{KIO}_3 \text{ taken-amount of } n/10\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ consumed} \times 0.01784) 0.1869 \times 100}{\text{Amount of material taken}}$$

If chloride is contained in the material, the correction for chloride is to be made, as 5 atoms of chlorine free one atom of iodine by this titration method. 1.207 mg.  $KIO_3$  corresponds to 1 mg. Cl. Müller recommended in case of urine to take 1 gm. of  $KIO_3$  for 10 cc. of urine.

From repeated determinations by this method, however, it has become evident, that it is necessary to pay careful attention about many points to get a steady and reproduceable result. The following points should be mentioned especially.

1. *Heating.* If we heat the mixture of test substance and reagents to a very high a temperature and heating is prolonged, too large an amount of iodate is decomposed, while if the heating is not sufficient, the oxidation becomes incomplete. Müller recommended in his paper to heat the mixture up to about  $200^{\circ}\text{C}$ . Testing with uric acid, I found it necessary to take the following precautions.

The mixture of substance to be tested and of reagents ought to be heated carefully up to  $180^{\circ}$  in the course of one hour. The heating bath as described in figure 1 was found to be very convenient. The bath consists of a can (A) about 15 cm. wide in diameter and 15 cm. high, with two holes on the deck, of which the central larger one is to receive the neck of the digesting flask (B), while the other small hole is fitted with thermoregulator C. The can contains a layer of sand about 5 cm. thick.



The digesting flask, consisting of Erlenmeyer's flask of 500 cc. contents and made of hard glass, is inserted with a thermometer.

The thermoregulator contains liquid paraffin as an expanding fluid. The whole can is placed on a wire gauze, covered with a coppery cover (E) with asbestos covering inside, and carefully heated with a Bunsen burner. When the content of the digesting flask is heated up to  $18^{\circ}$ , the heat is maintained at that temperature for exactly two hours. The burner is then turned off and the content hereafter treated just as in the original method.

2. The amount of iodate used for each oxidation was 0.5 gm. as it gave us a better result than the amount used in the original method. (1 gm.) In case of dry test substance, about 5–10 cc. of water was previously added to iodate, or 10 cc. of 5 per cent (nearly

saturated) solution of iodate was taken, to which are added 20 cc. of concentrated sulphuric acid, and after about 15 minutes a suitable amount of test substance was introduced.

3. In case of the urine of herbivora, 5 cc. of urine are taken for 0.5 gm. of iodate. With the urine of carnivora, which is much more concentrated than that of herbivora, it is diluted with four times its volume of water and 5 cc. of the diluted urine is used. Diluted human urine is used directly, while the concentrated one is better diluted two or three times with water.

### III. THE VARIATION IN THE RATIO VAKAT $O_2$ : TOTAL NITROGEN OF URINE IN VARIOUS CIRCUMSTANCES.

#### 1. *Variation with the diet.*

That the ratio Vakats  $O_2$  to total nitrogen varies with the nature of the diet is obvious. Under the same circumstance, however, the ratio remains constant. This is seen in table I.

It is therefore urgently necessary to pay full attention to the nature and quantity of diet, if we wish to compare the effect of various conditions on the value of Vakats  $O_2$ -nitrogen ratio.

#### 2. *The effect of extirpation of thyroid gland.*

As is already known, the extirpation of thyroid glands depresses the body metabolism quite a deal. Nitrogen in urine is said to decrease ordinarily, but sometimes it increases a little. 5 rabbits, weighing about 2 kg., were operated on for the extirpation of thyroid gland. Before the operation each animal was tested for the amount of oxygen consumption, nitrogen, Vakats oxygen and the ratio Vakats  $O_2$ /nitrogen for 4 days. After the lapse of 7 days after the operation, the amount of the oxygen consumption was measured daily by means of Krogh's respirometer and the value of nitrogen and Vakats oxygen of carefully collected urine was also measured. The results are shown in table II.

TABLE I.

Animals	Body weight	O <sub>2</sub> consumed per 30 minute	Total nitrogen	Total Vakut O <sub>2</sub>	Vakut O <sub>2</sub> nitrogen	Season	Diet	
Rabbit No. 1	gm. 2075	gm. 653	gm. 1.7879	gm. 1.3251	0.747	May	Okara 250 g. green vegetables 100 g.	
2	2103	656	1.6873	1.0970	0.687			
3	2110	553	1.6560	1.2808	0.773			
4	2080	577	1.6540	1.1590	0.693			
5	2027	708	1.6355	1.1493	0.703			
Average	2.079	629	1.6841	1.2022	0.721			
Rabbit No. 1	2201	470	1.7274	1.1563	0.671	Late in June	Okara 300 g. vegetables 100 g.	
2	2175	556	1.7268	1.2421	0.718			
3	2429	600	1.8135	1.2715	0.699			
4	2344	550	1.6235	1.3021	0.805			
Average	2.287	544	1.7228	1.2430	0.723			
Cat No. 1	2450	810	1.6968	1.2336	0.727	October	Dried bonito 50 g. rice 75 g.	
2	2385	728	1.5428	1.0686	0.715			
3	2473	757	1.5136	1.0262	0.678			
4	2552	780	1.6330	0.9191	0.563			
5	2398	683	1.4425	0.8950	0.621			
Average	2452	752	1.5757	1.0285	0.661			
Cat No. 6	3547	1100	2.8051	2.1400	0.763	Feb-ruaro	Boiled fish 75 g. rice 75 g.	
7	2745	817	2.1798	2.1339	5.979			
8	3065	987	2.2197	1.4851	0.669			
9	2630	750	1.8522	1.7426	0.941			
13	3070	883	2.3050	1.9602	0.850			
14	3593	883	2.5163	2.1123	5.840	May		
18	2992	867	3.2323	2.5381	0.785			
19	3050	883	2.6404	1.9681	0.746			
20	3462	693	2.7432	1.8512	0.675			
Average	3017	874	2.4990	1.9924	0.805			
21	2549	710	1.3160	1.5308	1.163	May	Salmon 75 g. rice 75 g.	
22	2627	747	1.4301	1.7093	1.131			
23	2868	850	1.4986	1.6526	1.103			
Average	2681	769	1.4149	1.6309	1.132			

TABLE II.

The effect of extirpation of thyroid gland. Each value representing an average of 3 days normal (a) and inanition period (b).

Cat. No.	Period	Body weight		Volume of urine	Consumed O <sub>2</sub> per 0.5 hour		Total amount of nitrogen excreted daily (average value)		Vakat-O <sub>2</sub> per day		Vakat-O <sub>2</sub> nitrogen	
		absol.	perc.		absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.
1	{ a b	g 2027	%	292	cc. 708	%	1.6355	%	1.1493	%	0.703	%
		2120	105	267	467	66	1.5520	95	0.9771	85	0.640	91
2	{ a b	2080	108	288	577	72	1.6540	108	1.1590	101	0.693	92
		2241		307	417		1.7826		1.1686		0.645	
2	{ a b	2110	106	311	553	74	1.6560	91	1.2808	86	0.773	93
		2244		259	408		1.5121		1.0969		0.717	
4	{ a b	2103	107	308	656	59	1.6873	101	1.0970	93	0.687	87
		2246		286	385		1.7058		1.0201		0.598	
5	{ a b	2075	107	314	653	59	1.7879	93	1.3251	76	0.747	81
		2248		280	383		1.6622		1.0074		0.605	
Average	{ a b	2079	107	306	629	66	1.6841	98	1.2022	88	0.721	89
		2214		280	412		1.6429		1.0540		0.641	

As is clear from the table, the metabolic amount decreases down to about 60 per cent of the original value. The total amount of nitrogen in urine does not change much from the normal value, while the Vakats oxygen is almost always decreased. The ratio Vakats  $O_2$ :nitrogen is therefore decreased when compared with normal value. Though the thyroid extirpation diminishes the total energy expenses of the body, it makes almost no changes in the amount of nitrogen metabolism. Vakats  $O_2$  however decreases, probably because of the diminution of the metabolic change of non proteinous matter. In this case, the amount of nitrogen metabolism and degree of oxidation are not influenced, while the amount of oxidation is very much decreased.

### 3. *Effect of feeding with thyroid gland.*

4 male rabbits were given daily 0.7 gm. of thyroid preparates. Both during four days before the feeding and during four days from the 4th day of the feeding period, the oxygen consumption of animal for 0.5 hour, total nitrogen and total Vakats oxygen of urine were measured, and the ratio  $\frac{\text{Vakats } O_2}{\text{nitrogen}}$  was calculated. The result is shown in table III.

The table indicates that with the increase of oxygen uptake, thyroid feeding induces, augmentation of both nitrogen excretion and Vakats- $O_2$ . In this case, the increase in Vakats  $O_2$  (48%) goes parallel with the increase of the total metabolism (42%), while the metabolism of nitrogenous matter seems to be of rather secondary importance (increase 28%). The amount of oxidation is greatly increased, while the degree of oxidation is decreased. Although both the nitrogen excretion in urine and Vakats  $O_2$  are increased, the amount of Vakats  $O_2$  is much larger than that of the nitrogen metabolised. Accordingly this result indicates that in case of thyroid feeding the degree of oxidation is decreased, while the amount of oxidation is very much augmented. The ratio Vakats  $O_2$ :nitrogen is increased more than in normal conditions.

TABLE III.

Effect of feeding with thyroid gland

Each value representing an average of 4 days normal (a) and thyroid fed (4th-7th) days.

Cat. No.	Period	Body weight		Volume of urine	Consumed O <sub>2</sub> per 0.5 hour		Total amount of nitrogen excreted daily (average value)		Vakat-O <sub>2</sub> per day		Vakat-O <sub>2</sub> nitrogen	
		absol.	perc.		absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.
6	{ a b	g 2201	%	282	cc. 470	%	1.7274	%	1.1563	%	0.671	%
		2155	98	350	783	167	2.2778	132	1.6692	144	0.739	109
7	{ a b	2175		297	536		1.7368		1.2421		0.718	
		2138	98	342	748	135	2.2173	128	1.9127	154	0.810	113
8	{ a b	2429		293	600		1.8135		1.2715		0.699	
		2285	94	358	765	127	2.1172	117	1.8225	143	0.885	126
9	{ a b	2344		267	550		1.6235		1.3021		0.805	
		2245	96	335	803	145	2.2409	138	1.8481	142	0.823	102
Average	{ a b	2287		285	544		1.7228		1.2430		0.723	
		2206	97	346	774	144	2.2133	129	1.8131	146	0.821	112

#### 4. *Effect of extirpation of the adrenal gland.*

The extirpation of the adrenal gland was performed on a cat, as this animal is free from the accessory adrenal glands. The extirpation was carried out at one operation. The animal was fixed in a dorsal position, narcotised with chlorethyl at first and narcosis continued with ether, always under the continual streaming of oxygen. Parallel with and about 5 cm lateral to the back bone, a skin incision was made, dissected carefully with the spatula and the suprarenal body was easily isolated and extirpated. When one suprarenal body is extirpated, the other gland is also extirpated successively at one session. After ligation the wound was covered with collodium. Directly before the operation and in two succeeding periods after the operation, three days urine were collected and their nitrogen amount and Vakats  $O_2$  were measured. The result is given in table IV.

We can see from the table that oxygen consumption decreases continually after the operation. Both the total nitrogen excretion and total Vakats  $O_2$  decrease also with days. The decrease in nitrogen is larger than that in total Vakats  $O_2$  so that their ratio becomes larger than in normal days.

The extirpation of adrenal gland decreases the excretion of nitrogen and the value of Vakats- $O_2$  quite a good deal. This decrease, however, may be due partly to the incomplete urine excretion. The amount of urine excreted after the operation decreases down to one-third of the normal value and the urine is very much concentrated. It seems therefore recommendable to try to increase the amount of urine. Although this may be done by several treatments, I administered adrenalin for this purpose. The reason of this was also to find out how the administration of adrenalin, the principle substance produced in marrow layer of the suprarenal gland, modifies the effect in epinephrectomized animals. Before trying this experiment, it is necessary to know the effect of adrenalin administration on the animal both of normal feeding and of inanition period.

TABLE IV.  
Effect of extirpation of adrenal gland.  
Each value representing an average of 3 days normal (a) and the first and second inanition periods ( $b_1$  and  $b_2$ ).

Cat. No.	Period	Body weight		Volume of urine	Consumed O <sub>2</sub> per 0.5 hour		Total amount of nitrogen excreted daily (average value)		Vakat-O <sub>2</sub> per day		Vakat-O <sub>2</sub> nitrogen	
		absol.	perc.		absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.
6	a	g	%	300	cc.	%	2.8051	%	2.1400	%	0.763	%
	b <sub>1</sub>	3547	99	135	1100	78	1.5813	56	1.5104	71	0.956	125
	b <sub>2</sub>	3174	89	84	723	66	0.8310	29	0.8022	37	0.965	125
7	a	2745		270	817		2.1798		2.1339		0.979	
	b <sub>1</sub>	2523	92	100	633	77	0.9637	44	0.9925	47	1.030	105
	b <sub>2</sub>	2300	84	90	520	64	0.4767	22	0.6981	35	1.465	145
8	a	3065		210	987		2.2197		1.4851		0.669	
	b <sub>1</sub>	2907	95	115	740	75	1.0331	46	1.5370	92	0.320	197
	b <sub>2</sub>	2710	88	76	613	62	0.5976	27	0.4517	30	0.756	113
9	a	2630		135	750		1.8522		1.7426		0.941	
	b <sub>1</sub>	2490	95	65	553	74	0.7887	43	0.7905	45	1.002	109
	b <sub>2</sub>	2363	90	56	440	59	0.3853	21	0.4721	27	0.229	131
Average	a	2997		229	914		2.2642		1.8754		0.838	
	b <sub>1</sub>	2837	95	104	696	76	1.0917	47	1.1626	64	1.077	137
	b <sub>2</sub>	2637	88	77	574	63	0.5727	25	0.6060	32	1.104	134

### 5. *The effect of adrenalin on the normally fed animal.*

Three normally fed cats were injected with adrenalin in doses of 0.2 mg in the first day, 0.4 mg. in both second and third day. In this period all animals remained as normal and took the ration presented entirely. The urine volume increased. When we injected animals with 0.5 mg on the fourth day, and with 1 mg on fifth and sixth days, the animal refused to eat all of the ration. We rejected therefore the result obtained in this second period as being unsuited for the experiment in normally fed animals. The result in the first 3 days period is given in table V.

As is clear from the table, the nitrogen metabolism and the amount of daily metabolism remained uninfluenced by the adrenalin injection, while Vakats  $O_2$  and the ratio Vakats  $O_2$ :nitrogen became increased, the reasons for these being the appearance of a small amount of sugar in urine caused by adrenalin hyperglycemia.

### 6. *The effect of inanition.*

In experiments, in which the adrenal glands were entirely extirpated, the animal is emancipated and takes no food. This condition necessitated us to study the effect of inanition.

In the case of inanition, the result is free from the effect of nature and quantities of diet on the ratio Vakats  $O_2$ -nitrogen. The ratio can vary, however, according to the nature and amount of body material burned inside depending largely on two kinds of changes. One of these changes is the portion of energy supplied by body protein to the total metabolism. While the deposited amount of carbohydrate and fat within the animal body remains sufficient, the excretion of nitrogen does not amount to much, even in a later stadium of inanition. The other is the amount of available carbohydrate in the body, the deficiency of this inducing the acidosis — the overproduction of aceton bodies due to the incomplete oxidation of fatty substances — which increases the value

TABLE V.  
The effect of adrenalin on the normally fed animal.  
Each value representing an average of 3 days normal (a) and adrenaline  
period (b).

Cat. No.	Period $\left\{ \begin{array}{l} a \\ b \end{array} \right.$	Body weight		Volume of urine	Consumed O <sub>2</sub> per 0.5 hour		Total amount of nitrogen excreted daily (average value)		Vakat-O <sub>2</sub> per day		Vakat-O <sub>2</sub> nitrogen	
		absol.	perc.		absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.
10	a	g. 2848	% 99	cc. 177	cc. 783	% 98	g. 1.7388	% 104	g. 1.5098	% 113	0.883	% 106
	b	2825		231	767		1.8057		1.6998		0.941	
11	a	3490		232	770		2.3169		2.2771		0.981	
	b	3437	98	280	773	100	2.3063	100	2.9949	131	1.038	106
12	a	2472		210	667		1.8767		1.4063		0.749	
	b	2420	98	216	623	94	1.9162	102	1.6258	116	0.849	113
Average	a	2927		206	740		1.9775		1.7311		0.871	
	b	2894	98	242	721	97	2.0094	102	2.1063	120	0.943	108

of Vakats  $O_2$  in comparison to that of nitrogen. To see how these two factors influence the value of ratio Vakats  $O_2$ :nitrogen, the following experiments were performed. Two sets of cats were nourished either with dried lean meat of bonito and rice, or with boiled fatty fish meat and rice for one to four weeks previously and the Vakats  $O_2$  and nitrogen values of urine were determined for 3 days.

The animals were then deprived of food for 7 days allowing only access to water. During this time the amount of the oxygen consumption of animals was taken daily. The urine was collected into two three-days-portions, i.e. the one of 2nd – 4th. inanition day and the other of 5th – 7th day. The urine was protected against deterioration by means of toluene and preserved in an ice chest. Aliquot portions of urine were used for the determination of nitrogen and Vakats  $O_2$ . The result is given in table VI.

As is clear from the table, basal metabolism of the animal decreases with days of inanition, tending however to a constant value already at its fifth day. The excretion of nitrogen is the least in the first period of inanition, while in the second period the body protein seems to be burned more to compensate the deficiency in reserve carbohydrate. Together with this, Vakats  $O_2$  urine in the second period is also increased in comparison to that of the first period. The ratio of Vakats  $O_2$  to nitrogen does not however differ much between these two periods. It can be seen from the table also that the simple inanition raises the ratio about 50 per cent. The increase in Vakats  $O_2$  is certainly due to the appearance of acetone bodies in urine.

#### 7. *The effect of inanition with daily adrenalin injection.*

Under this condition, the animal began vomiting in the fifth or sixth day of the experiment, and showed continuous salivation. These phenomena disappear whenever the injection of adrenalin is discontinued. The oxygen consumption and nitrogen excretion and Vakats  $O_2$  value of urine in this period is given in table VII.

TABLE VI.

The effect of inanition.

Each value representing an average of 3 days normal (a) and inanition periods

(b<sub>1</sub> and b<sub>2</sub>).

Cat. No.	Period	Body weight		Volume of urine	Consumed O <sub>2</sub> per 0.5 hour		Total amount of nitrogen excreted daily (average value)		Vakat-O <sub>2</sub> per day		Vakat-O <sub>2</sub> nitrogen	
		absol.	perc.		absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.
13	a	g	%	cc.	cc.	%	g	%	g	%	g	%
	{ b <sub>1</sub>	3070	91	190	883	78	2.3050	54	1.9602	76	0.850	141
	{ b <sub>2</sub>	2787	85	120	690	69	1.2404	59	1.4858	85	1.200	142
14	a	3593		160	883		1.3706		2.1123		0.840	
	{ b <sub>1</sub>	3517	98	125	733	83	1.3125	52	1.2708	60	0.980	117
	{ b <sub>2</sub>	3303	92	140	660	75	1.7480	70	2.1936	104	1.252	149
15	a	2313		260	763		1.7169		0.9022		0.526	
	{ b <sub>2</sub>	2073	90	96	563	74	1.0349	60	0.9576	106	0.925	176
16	a	3036		414	910		1.9900		1.1682		0.587	
	{ b <sub>2</sub>	2696	89	117	643	71	1.4387	72	1.2174	105	0.846	144
17	a	2203		417	837		1.6346		1.5408		0.943	
	{ b <sub>2</sub>	1840	82	93	612	72	1.1327	69	1.2240	80	1.081	115
Average	a	2843		288	859		2.0326		1.1536		0.749	
		3152	95	123	712	81	1.2765	53	1.3783	68	1.090	129
		2506	88	111	626	72	1.3450	66	1.4523	66	1.062	145

TABLE VII.  
The effect of inanition with daily adrenaline injection.  
Each value representing an average of 3 days normal (a), inanition (b<sub>1</sub>) and  
adrenaline period (b<sub>2</sub>).

Cat. No.	Period	Body weight		Volume of urine	Consumed O <sub>2</sub> per 0.5 hour		Total amount of nitrogen excreted daily (average value)		Vakat-O <sub>2</sub> per day		Vakat-O <sub>2</sub> nitrogen	
		absol.	perc.		absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.
18	a	g	%	cc.	cc.	%	g	%	g	%		%
	b <sub>1</sub>	2992		333	867		3,2523		2,5381		0.785	
	b <sub>2</sub>	2842	95	312	740	85	2,0259	63	2,6359	104	1.301	166
19	a	2547	85	225	520	60	2,0633	64	1,5000	59	0.727	92
	b <sub>1</sub>	3050		230	883		2,6404		1,9681		0.746	
	b <sub>2</sub>	2303	95	213	750	85	1,2823	49	1,6071	82	1.253	168
20	a	2767	91	180	500	57	1,4070	53	1,0383	52	0.738	99
	b <sub>1</sub>	2462		240	693		2,7432		1,8512		0.675	
	b <sub>2</sub>	2353	96	279	617	89	2,3501	86	2,5640	138	1.083	160
Average	a	2173	88	120	430	62	1,7640	64	1,2591	68	0.711	105
	b <sub>1</sub>	2835		268	814		2,8720		2,1190		0.735	
	b <sub>2</sub>	2699	95	268	702	86	1,8861	66	2,2690	108	1.212	165
		2496	88	175	483	60	1,7448	60	1,2658	60	0.729	100

As is seen in the table, oxygen consumption, nitrogen amount and Vakats oxygen decrease in almost the same amount so that the ratio Vakats  $O_2$ :nitrogen remains the same as in normal conditions. The simple inanition invokes the increase of Vakats  $O_2$ :nitrogen, while the adrenaline injection to this animal releases the ratio to its normal value. This is quite conceivable when we consider that the oxidation of fatty acid becomes incomplete as the glycogen utilisation in the body is meagre and induces the excretion of acetone bodies, while the adrenaline injection, although not enough to induce the glycosuria brings back the degree of oxidation to the normal level.

8. *The effect of adrenal extirpation supplied with  
adrenal injection.*

We have seen in the foregoing section that although both nitrogen excretion and Vakats- $O_2$  value decrease after the adrenal extirpation, the ratio  $\frac{\text{Vakats-}O_2}{\text{nitrogen}}$  is increased much more than in normal. To see how the absolute amount of nitrogen excreted and the value of Vakats- $O_2$  of urine and also their ratio is modified by the application of adrenaline, an increasing amount of adrenaline was injected daily to the operated animal and the determination of nitrogen and Vakats- $O_2$  was carried out just as in the experiment described in the foregoing section. The result is shown in table VIII.

As can be seen in the table, adrenalin injection induces an increase of urine in comparison with the adrenal extirpation without adrenalin injection and both nitrogen and Vakats- $O_2$  are also increased. As the increase in nitrogen is, however, far greater than that of Vakats- $O_2$ , their ratio becomes less, the value being even less than in normal condition.

Adrenalin injection to the epinephrectomized animal brings back the value of Vakats-oxygen to normal, though corresponding to the diminution of metabolism.

TABLE VIII.

The effect of adrenal extirpation supplied with adrenal injection.

Each value representing an average of 3 days normal (a) and inanition period (b<sub>1</sub> and b<sub>2</sub>).

Cat. No.	Period	Body weight		Volume of urine	Consumed O <sub>2</sub> per 0.5 hour		Total amount of nitrogen excreted daily (average value)		Vakat-O <sub>2</sub> per day		Vakat-O <sub>2</sub> nitrogen	
		absol.	perc.		absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.	absol.	perc.
21	a	g	%	cc.	cc.	%	g	%	g	%	absol.	%
	b <sub>1</sub>	2548	92	150	710	—	1.3160	100	1.5308	61	1.163	61
	b <sub>2</sub>	2348	89	99	—	44	1.3098	60	0.9337	50	0.713	82
22	a	2268	96	84	313	—	0.7935	74	0.7468	45	0.941	74
	b <sub>1</sub>	2627	90	135	747	46	1.4301	58	1.7093	45	1.131	81
	b <sub>2</sub>	2502	90	114	—	—	1.0480	60	0.8770	45	0.837	76
23	a	2365	86	90	340	—	0.8337	56	0.7676	46	0.921	84
	b <sub>1</sub>	2868	90	144	850	46	1.4986	60	1.6526	45	1.103	76
	b <sub>2</sub>	2564	86	96	—	—	0.8893	56	0.7453	46	0.838	84
Average	a	2462	93	99	390	—	0.8478	78	0.7559	47	0.920	70
	b <sub>1</sub>	2681	88	110	769	—	1.4149	58	1.6309	47	1.132	82
	b <sub>2</sub>	2707	88	103	—	—	1.0824	58	0.8517	47	0.796	70
Average	a	2032	93	90	348	45	0.8250	58	0.7508	47	0.927	82
	b <sub>1</sub>	2681	93	110	769	—	1.4149	78	1.6309	47	1.132	70
	b <sub>2</sub>	2707	88	103	—	—	1.0824	58	0.8517	47	0.796	70

#### SUMMARY.

1. A modification of the Müller Vakut-oxygen method is presented.

2. Extirpation of thyroid gland induces a decrease in amount of oxygen consumption. The degree of oxidation, however, is not interfered with much.

3. The feeding of the thyroid gland increases the amount of oxidation, while the degree of oxidation is decreased far below normal.

4. Suprarectomy results in the decrease in both the amount of nitrogen and in the total metabolism. The degree of oxidation seems, however, not much influenced.

#### REFERENCES.

- Bickel (1925): *Bioch. Z.*, **166**, 251.  
Müller (1927): *Bioch. Z.*, **186**, 451.  
Rubner (1885): *Z. f. Biol.*, **21**, 329.



## DIE SPLANCHNIKOTOMIE UND DIE WIRKUNG DER CHOLSÄURE AUF DIE KREATININAUSSCHIEDUNG.

VON

AIJIRO TAKU.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Okayama.  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 10. September 1930.)

Wie in einer früheren Mitteilung (Kaziro u. Taku, 1929) berichtet, habe ich beim Kaninchen festgestellt, dass die Kreatininausscheidung im Harn durch die Injektion von Cholsäure herabgesetzt, aber durch die von Adrenalin gesteigert wird. Dabei habe ich auch gefunden, dass die Wirkung der Cholsäure und des Adrenalins sich bei gleichzeitiger Zufuhr der Substanzen, je nach ihrem Mengenverhältnis, gegeneinander ausgleichen. Für das Wesen dieser Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung steht die Frage noch offen, ob sie sich auf das vegetative Nervensystem bezieht, oder unmittelbar von der Sekretion des Adrenalins aus den Nebennieren abhängig ist. Der Antagonismus zwischen Adrenalin und Gallensäure bei dem Kohlenhydratstoffwechsel wurde schon von Misaki (1928), Okamura (1928) u.a. in hiesigem Institut bewiesen, und es wurde auch die Tatsache wahrgenommen, dass die Zufuhr von Gallensäure die Sekretion des Adrenalins aus der Nebenniere hemmt. Nun liegt der Gedanke nahe, die Wirkung der Gallensäure auf die Kreatininausscheidung als eine Folge der durch Gallensäure bedingten Mindersekretion des Adrenalins aus der Nebenniere, oder der Tonusherabsetzung der sympathischen Nervenregung zu betrachten. Wenn also der Einfluss der Cholsäure auf die Sekretionstätigkeit der Nebenniere durch irgendeinen Eingriff beseitigt wird, so könnte man einen besseren Einblick in das Wesen der Cholsäurewirkung gewinnen. Es sei hier auch bemerkt, dass der Eiweisstoffwechsel durch die

subkutane Injektion von Gallensäure herabgesetzt wird, wie es schon von Karasawa (1927) festgestellt wurde. Die durch Zufuhr von Cholsäure herabgesetzte Kreatininausscheidung dürfte daher wohl eine ursächliche Erscheinung des herabgesetzten Eiweisstoffwechsels sein.

Ich habe in den Versuchen der vorliegenden Mitteilung die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung an splanchnikotomierten Kaninchen studiert, um Kenntnis von der Wirkungsweise der Cholsäure zu erhalten. Bei einem solchen Tier habe ich festgestellt, dass die Kreatininausscheidung durch den Harn durch Ausschaltung der beiden Splanchnikusnerven herabgesetzt wird, wie es schon vor langem von Kure (1921) und seinen Mitarbeitern im Muskel nachgewiesen wurde. Sie haben festgestellt, dass der Kreatiningehalt des Muskels durch Exstirpation von postganglionären Fasern der Splanchnikusnerven herabgesetzt und durch Injektion von Adrenalin wieder auf den Normalwert gebracht wird. Die Wirkungsstelle des Adrenalins ist bekanntlich an der "rezeptiven Zwischensubstanz" nach Langley (1905), die zwischen Muskel und Nervenendigung des Sympathikus liegen muss. Eine weitere Herabsetzung der Kreatininausscheidung durch Cholsäure konnte ich jedoch bei dem splanchnikotomierten Kaninchen nicht erzielen, obwohl die Cholsäure dem Kaninchen in hinreichender Menge injiziert wurde. Die herabsetzende Wirkung der Cholsäure wurde also durch die Splanchnikotomie völlig aufgehoben.

Auf Grund dieser Daten kann man wohl mit Recht behaupten, dass die Wirkung der Cholsäure eine nervöse, und zwar nicht eine periphere, sondern mehr eine zentrale und mit der Funktion der Splanchnikusnerven engst verknüpfte ist. Ich könnte auch die Wirkung der Cholsäure als eine mittelbare Folge der Mindersekretion des Adrenalins aus den Nebennieren betrachten, weil das Adrenalin bekanntlich den sympathischen Tonus für sich gewährleistet.

**Experimenteller Teil.**

Als Versuchstiere benutzte ich durchweg männliche, gut genährte Kaninchen von ca 2–3 kg Körpergewicht. Die Kreatininausscheidung wurde regelmässig alle 1½–2 Stunden verfolgt. Die Methode ist in unserer vorigen Mitteilung (Kaziro u. Taku, 1929) angegeben. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt:

TABELLE I. Normalversuch.

## Versuch 1. (6./XI.) Körpergewicht 2190 g

Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
7,30– 9,00 a.m.	alkalisch	3,82	Ohne Injektion
9,00–10,30 „	neutral	3,82	
10,30– 0,00 „	„	3,84	
0,00– 1,30 p.m.	sauer	3,74	
1,30– 3,00 „	„	3,68	

## Versuch 2. (14./X.) Körpergewicht 2670 g

Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
7,00– 9,00 a.m.	neutral	8,10	Ohne Injektion
9,00–11,00 „	„	8,10	
11,00– 1,00 p.m.	„	7,79	
1,00– 3,00 „	sauer	8,44	
3,00– 5,00 „	„	7,79	

## Versuch 3. (17./X.) Körpergewicht 2550 g

Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
7,00– 9,00 a.m.	neutral	8,80	← 6,4 ccm 1%ige Na-cholatlösung subkutan. 9,10 a.m.
9,00–11,00 „	„	8,10	
11,00– 1,00 p.m.	„	7,86	
1,00– 3,00 „	sauer	8,52	
3,00– 5,00 „	„	9,00	

## Versuch 4. (25./X.) Körpergewicht 1865 g

7,00– 9,00 a.m.	neutral	5,96	<4,7 cem 1%ige Na-cholatlösung subkutan. 9,10 a.m.
9,00–11,00 „	„	5,40	
11,00– 1,00 p.m.	„	5,55	
1,00– 3,00 „	„	5,79	

## Versuch 5. (26./X.) Körpergewicht 1760 g

7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	5,70	<4,4 cem Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m.
9,00–11,00 „	neutral	5,19	
11,00– 1,00 p.m.	„	4,94	
1,00– 3,00 „	„	5,79	

## Versuch 6. (7./XI.) Körpergewicht 2165 g

7,30– 9,00 a.m.	alkalisch	4,76	<5,4 cem 1%ige Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m.
9,00–10,30 „	„	3,86	
10,30– 0,00 „	„	4,25	
0,00– 1,30 p.m.	„	3,75	
1,30– 3,00 „	„	3,86	

*I. Normalversuche. (Tabelle I.)*

In den Versuchen 1 und 2 der Tabelle I habe ich die normale Schwankung der Kreatininausscheidung  $1\frac{1}{2}$ –2 stündlich verfolgt. Die normale stündliche Kreatininausscheidung zeigt stets nur eine sehr geringe Schwankung, wie schon in meiner vorigen Mitteilung angegeben worden ist. In den Versuchen 3–6 habe ich die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung  $1\frac{1}{2}$ –2-stündlich verfolgt. Die Cholsäure wurde immer als 1%ige Na-cholatlösung, 2,5 cem pro kg Körpergewicht, injiziert. Wie in der Tabelle angegeben ist, setzt die Cholsäure in allen Fällen die Kreatininausscheidung herab.

TABELLE II.

Versuche mit splachnikotomierten Kaninchen.

Versuch 1. (8./XI.) Körpergewicht 2080 g

Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	7,94	Ohne Injektion
9,00–11,00 „	„	8,10	
11,00– 1,00 p.m.	„	8,10	
1,00– 3,00 „	„	8,18	

Versuch 2. (8./X.) Körpergewicht 1900 g

7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	8,18	← 4,7 ccm 1%ige Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m.
9,00–11,00 „	„	8,18	
11,00– 1,00 p.m.	neutral	7,86	
1,00– 3,00 „	„	8,27	
3,00– 5,00 „	sauer	8,10	

Versuch 3. (10./X.) Körpergewicht 1625 g

7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	5,87	← 4,0 ccm 1%ige Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m.
9,00–11,00 „	„	6,00	
11,00– 1,00 p.m.	neutral	6,00	
1,00– 3,00 „	„	5,96	
3,00– 5,00 „	„	6,00	

Versuch 4. (15./X.) Körpergewicht 1485 g

7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	5,47	4,00 ccm 1%ige Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m.
9,00–11,00 „	sauer	5,47	
11,00– 1,00 p.m.	„	5,47	
1,00– 3,00 „	„	5,63	

## Versuch 5. (11./XI.) Körpergewicht 2300 g

7,00– 9,00 a.m.	neutral	6,53	← 5,7 ccm Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m.
9,00–11,00 „	„	6,65	
11,00– 1,00 p.m.	„	6,70	
1,00– 3,00 „	„	6,65	
3,00– 5,00 „	sauer	6,65	

## Versuch 6. (12./XI.) Körpergewicht 2515 g

7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	7,30	← 6,5 ccm 1%ige Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m.
9,00–11,00 „	neutral	7,27	
11,00– 1,00 p.m.	„	7,64	
1,00– 3,00 „	sauer	7,36	
3,00– 5,00 „	„	7,06	

II. Versuche mit splachnikotomierten Kaninchen.  
(Tabelle II)

Im Versuch 1 der Tabelle II habe ich die Kreatinin-ausscheidung bei einem splachnikotomierten Kaninchen 2-stündlich verfolgt, die jedoch keine merkbare Schwankung zeigte. In den Versuchen 2–6 habe ich die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung bei splachnikotomierten Kaninchen beobachtet. Wie in der Tabelle angegeben, scheint die Wirkung der Cholsäure durch Splachnikotomie völlig aufgehoben zu werden. Die Kaninchen wurden immer erst drei bis sechs Tage nach der Operation zum Versuche benutzt, nachdem sich die Tiere von den operativen Eingriffen genügend erholt hatten.

Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung. 377

TABELLE III.

Normal- und Splanchnikotomieversuch bei demselben Kaninchen.

Versuch 1.					
Datum	Körpergewicht g	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
11./X.	2810	7,00– 9,00 a.m.	neutral	13,21	← 4,0 ccm 1%iger Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m. (1,5 ccm pro kg Körpergewicht.)
		9,00–11,00 „	sauer	12,46	
		11,00– 1,00 p.m.	„	11,57	
		1,00– 3,00 „	„	11,74	
		3,00– 5,00 „	„	12,46?	
12./X.	2800	Splanchnikotomie.			
16./X.	2655	7,00– 9,00 a.m.	neutral	7,64	← 6,7 ccm 1%iger Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m. (2,5 ccm pro kg Körpergewicht.)
		9,00–11,00 „	„	7,79	
		11,00– 1,00 p.m.	„	7,79	
		1,00– 3,00 „	sauer	8,10	
		3,00– 5,00 „	„	7,79?	
20./X.	2550	7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	7,36	← 6,4 ccm Na-cholatlösung, subkutan. 9,10 a.m.
		9,00–11,00 „	„	6,95	
		11,00– 1,00 p.m.	neutral	7,23	
		1,00– 3,00 „	„	7,23	
		3,00– 5,00 „	„	7,23?	
4./XI.	2400	7,30– 9,00 a.m.	neutral	4,45	← 6,0 ccm Na-cholatlösung, subkutan. 9,40 a.m.
		9,00–11,30 „	„	4,40	
		11,30– 0,00 „	„	4,45	
		0,00– 1,30 p.m.	„	4,43	
		1,30– 3,00 „	„	4,71	

## Versuch 2.

Datum	Körpergewicht g	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
18./X.	2260	7,00– 9,00 a.m.	sauer	7,36	← 5,7 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 9,10 a.m.
		9,00–11,00 „	„	6,48	
		11,00– 1,00 p.m.	„	5,79	
		1,00– 3,00 „	„	7,55	
4./XI.	2110	8,00–10,00 a.m.	neutral	7,96	← 5,3 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 10,10 a.m.
		10,00– 0,00 „	„	5,46	
		0,00– 2,00 p.m.	sauer	6,86	
		2,00– 4,00 „	„	7,23	
5./XI.	2110	Splanchnikotomie.			
8./XI.	1915	8,00–10,00 a.m.	neutral	4,61	← 4,8 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 10,10 a.m.
		10,00– 0,00 „	sauer	4,71	
		0,00– 2,00 p.m.	„	4,71	
		2,00– 4,00 „	„	4,76	
11./XI.	1880	8,00–10,00 a.m.	neutral	5,40	← 4,7 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 10,10 a.m.
		10,00– 0,00 „	sauer	5,55	
		0,00– 2,00 p.m.	„	5,47	
		2,00– 4,00 „	„	5,33	
		4,00– 6,00 „	„	5,30?	

Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung. 379

Versuch 3.

Datum	Körpergewicht g	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
28./X.	1840	7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	6,33	← 4,6 cem Na-cholat- lösung, subkutan. 9,10 a.m.
		9,00–11,00 „	„	5,63	
		11,00– 1,00 p.m.	„	5,40	
		1,00– 3,00 „	sauer	5,70	
		3,00– 5,00 „	„	5,96	
29./X.	1825	Splanchnikotomie.			
1./XI.	1570	7,00– 9,00 a.m.	neutral	3,38	← 4,0 cem Na-cholat- lösung, subkutan. 9,10 a.m.
		9,00–11,00 „	sauer	3,68	
		11,00– 1,00 p.m.	„	3,38	
		1,00– 3,00 „	„	3,00	
		3,00– 5,00 „	„	2,89?	
9./XI.	1780	7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	4,22	← 4,5 cem Na-cholat- lösung, subkutan. 9,10 a.m.
		9,00–11,00 „	„	4,22	
		11,00– 1,00 p.m.	„	4,22	
		1,00– 3,00 „	„	4,40	
		3,00– 5,00 „	„	4,45?	

Versuch 4.

Datum	Körpergewicht g	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
27./X.	2055	7,00– 9,00 a.m.	alkalisch	6,23	← 5,1 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 9,10 a.m.
		9,00–11,00 „	„	5,79	
		11,00– 1,00 p.m.	„	5,87	
		1,00– 3,00 „	neutral	6,04	
		3,00– 5,00 „	„	5,87	
29./X.	2050	Splanchnikotomie.			
1./XI.	1770	7,00– 9,00 a.m.	neutral	5,06	← 4,5 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 9,10 a.m.
		9,00–11,00 „	„	5,00	
		11,00– 1,00 p.m.	sauer	5,06	
		1,00– 3,00 „	„	5,19	
		3,00– 5,00 „	„	4,82	
9./XI.	1980	7,00– 9,00 a.m.	neutral	6,27	← 5,00 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 9,10 a.m.
		9,00–11,00 „	„	5,94	
		11,00– 1,00 p.m.	„	6,36	
		1,00– 3,00 „	sauer	6,23	
		3,00– 5,00 „	„	6,23	

## Versuch 5.

Datum	Körpergewicht g	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
3./XI.	1780	8,00–10,00 p.m.	alkalisch	5,79	← 4,5 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 10,10 a.m.
		10,00– 0,00 „	„	4,29	
		0,00– 2,00 p.m.	„	4,50	
		2,00– 4,00 „	neutral	5,06	
		4,00– 6,00 „	„	5,33	
4./XI.	1785	Splanchnikotomie.			
7./XI.	1680	8,00–10,00 a.m.	neutral	3,38	← 4,2 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 10,10 a.m.
		10,00– 0,00 „	„	3,32	
		0,00– 2,00 p.m.	„	3,26	
		2,00– 4,00 „	„	3,43	
		4,00– 6,00 „	„	3,51?	
10./XI.	1755	8,00–10,00 a.m.	alkalisch	5,70	← 4,5 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 10,10 a.m.
		10,00– 0,00 „	neutral	5,40	
		0,00– 2,00 p.m.	„	5,63	
		2,00– 4,00 „	„	5,63	

## Versuch 6.

Datum	Körpergewicht g	Zeitabschnitt	Reaktion d. Harns	Kreatinin mg	Bemerkung
3./XI.	1775	8,00–10,00 a.m.	alkalisch	5,06	← 4,4 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 10,10 a.m.
		10,00– 0,00 „	„	4,55	
		0,00– 2,00 p.m.	„	3,86	
		2,00– 4,00 „	„	4,20	
		4,00– 6,00 „	„	4,76?	
6./XI.	1770	Splanchnikotomie.			
10./XI.	1540	7,00– 9,00 a.m.	sauer	4,71	← 4,0 ccm Na-cholat- lösung, subkutan. 9,10 a.m.
		9,00–11,00 „	„	4,55	
		11,00– 1,00 p.m.	„	4,76	
		1,00–3,00 „	„	4,76	
		3,00–5,00 „	„	4,82	

*III. Normal- und Splanchnikotomieversuche bei demselben Kaninchen. (Tabelle III.)*

Bei diesen Versuchen habe ich zuerst die Wirkung der Cholsäure bei dem gesunden Tier untersucht, dann wurden dem Kaninchen die Nervi splanchnici nach der Methode von Schulze doppelseitig durchschnitten, und es wurde wieder geprüft, ob die Kreatininausscheidung durch die Wirkung der Cholsäure ebenfalls beeinflusst wird.

Aus der Tabelle III ersieht man, dass die Kreatininausscheidung bei splanchnikotomierten Kaninchen durch die Zufuhr von Cholsäure in der Mehrzahl der Fälle nicht beeinflusst wird. Bei diesen Versuchen wurde die Cholsäure auch als 1%ige Na-cholatlösung, 2,5 cem pro kg Körpergewicht, subkutan injiziert.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Kreatininausscheidung im Harn beim Kaninchen wird durch die subkutane Zufuhr von Cholsäure herabgesetzt.

2. Diese Wirkung der Cholsäure wird durch Splanchnikotomie aufgehoben. Meine Ergebnisse stimmen mit denen von Tsuji in hiesigem Institut gut überein, dass nämlich die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch Splanchnikotomie völlig aufgehoben wird.

3. Diese Ergebnisse führen mich zu der Ansicht, dass die Wirkung der Cholsäure nicht als eine periphere, sondern mehr als eine zentrale zu betrachten ist.

LITERATUR.

- Karasawa, R. (1927): *Jl. of Biochem.*, **7**, 145.  
Kaziro, K. und Taku, A. (1929): *Jl. of Biochem.*, **11**, 203.  
Kuré, K., Shinozaki, T. u.a. (1921): *Tokio Igakkai Zassi*, **35**, 1029.  
Langley, J. N. (1905): *Jl. of Physiol.*, **33**, 375.  
Misaki, K. (1928): *Jl. of Biochem.*, **8**, 235.  
Okamura, Teiji (1928): *Jl. of Biochem.*, **8**, 271 und 445.



## DIE BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL.—IX.

### Über den Einfluss der Gallensäure auf die Zuckerassimilation. (II).

VON

SEI FUZITA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama.  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 14. September, 1930.)

In meiner ersten Mitteilung (1930) habe ich schon erwähnt, dass die durch Zufuhr von Zucker bedingte alimentelle Glykosurie des Kaninchenorganismus je nach der Zuckerart ganz verschieden ist, und dass die Ausscheidungsschwelle der verschiedenen Zuckerarten im Harn durch die Zufuhr von Cholsäure im allgemeinen herabgesetzt wird.

Weiter habe ich dabei festgestellt, dass der Fruchtzucker sowohl mit als auch ohne Zufuhr von Cholsäure bei den Zuckerarten: *d*-Glukose, *d*-Fruktose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose am wenigsten im Harn ausgeschieden wird, und dass auf diesen dem Ausscheidungsgrade nach *d*-Glukose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose folgen.

Dabei habe ich auch betont, dass die durch Zufuhr der Cholsäure bedingte Herabsetzung der Zuckerausscheidungsschwelle auf der den Glykogenaufbau fördernden Wirkung der Gallensäure beruht.

Es ist schon seit C. Voit (1892) und Weinland (1900) bekannt, dass die verschiedenen Monosaccharide, wie Glukose, Fruktose, Mannose und Galaktose, Glykogenbildner sind.

Wenn diese Zuckerarten durch Umlagerung in *r*-Zucker verwertet werden können, wie Bleyer u. Schmidt (1923) behauptet haben, und die Gallensäuren diese Umlagerung der Zuckerarten

beeinflussen können, wie es von Hatakeyama (1928) bewiesen wurde, so müssen die Gallensäuren bei der Glykogenbildung in der Leber im Sinne der Umlagerung eine gewisse Rolle spielen und auf die Glykogenbildung je nach der Zuckerart einen verschiedenen Einfluss ausüben.

Diese Umlagerung der Zuckerarten wird bekanntlich durch die OH-Ionen beeinflusst, wie Bleyer und Schmidt (1921) in ihren Versuchen schon bewiesen haben.

Nach den Angaben von Karasawa (1926/7), Hatakeyama (1927) und Sekitoo (1929) wird der Nucleinstoffwechsel durch die Gallensäure beeinflusst, indem bei Zufuhr der Gallensäure der Phosphorsäuregehalt des Harns sich vermehrt.

Andrerseits wurde von Okamura (1928) bewiesen, dass die Gallensäure die Nucleinasewirkung der Leber fördert.

Auf Grund der Daten kann man es wohl als möglich ansehen, dass die vermehrte Glykogenbildung in der Leber bei Zufuhr der Gallensäure auf der durch Phosphatpufferung bedingten Verschiebung der OH-Ionen beruht, weil das pH der Galle aus der Leber bei Zufuhr der Cholsäure gesteigert wird, wie schon Ito (1930) beim Hund bewiesen hat.

Im oben erwähnten Sinne habe ich den Einfluss der Gallensäure auf die Glykogenbildung aus verschiedenen Zuckern in der Leber des Kaninchens sowohl mit als auch ohne Zufuhr von Cholsäure untersucht.

### Experimenteller Teil.

Lange im Käfig gezüchtete kräftige Kaninchen wurden zuerst 4 Tage lang in Hunger gehalten, damit die Leber ungefähr von Glykogen frei werden konnte.

Dann wurden die verschiedenen Zuckerarten wie *d*-Glukose, *d*-Fruktose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose, je 3 g pro kg Körpergewicht, ohne oder mit 0.3 g Cholsäure pro kg Körpergewicht an die Kaninchen verfüttert.

Nach Verlauf von 3 Stunden wurden die Tiere unter Verblutung getötet, die Leber wurde schnell herausgeholt und gewogen.

Das Glykogen der Leber wurde nach Iwasaki und Mori (1926) in Zucker verwandelt, welcher nach Bertrand bestimmt und als Glykogen in Rechnung gebracht wurde. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen 1–4 zusammengestellt.

### 1. Versuch mit Fruchtzucker.

Aus den Versuchen A. u. B. der Tabelle I ersieht man, dass der Glykogengehalt der Leber bei alleiniger Zufuhr von Fruchtzucker durchschnittlich 2.748% beträgt.

Bei Zufuhr von Fruchtzucker mit Cholsäure steigert sich der Glykogengehalt der Leber bedeutend und beträgt durchschnittlich 4.178%.

Hierbei wurde gefunden, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Cholsäure durchschnittlich um 1.43% steigt. Demnach wird das Glykogen der Leber durch Fütterung mit Cholsäure durchschnittlich um 52.0% vermehrt.

TABELLE I. (Laevulose)

( A )

Datum	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
	Vor dem	Nach Hunger			
21./Jun.	2330	1940	38	2,686	Laevulose 3 g pro kg
„	2230	1880	45	2,763	
„	2020	1640	37	2,625	
„	1900	1500	33	3,025	
22	2300	1930	39	2,825	
„	2100	1830	35	2,625	
„	1730	1530	34	2,686	

Durchschnittswert 2.748

## ( B )

Datum	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
	Vor	Nach dem Hunger			
23./Jun.	2090	1750	42	4.488	Laevulose 3 g, Cholsäure 0.3 g pro kg
"	1830	1520	34	4.150	
"	1820	1520	35	4.213	
"	2200	1980	46	3.988	
24	2200	1850	45	4.425	
"	2320	1910	50	3.891	
"	2600	2210	50	4.088	
Durchschnittswert				4.178	

## 2. Versuch mit Traubenzucker.

Die Versuche A und B der Tabelle II zeigen, dass der Glykogengehalt der Leber beim Kontrollversuch (A der Tabelle II) durchschnittlich 1.891% beträgt, während er bei Zufuhr von Traubenzucker mit Cholsäure durchschnittlich als 2.831% gefunden wird.

Auch hier fördert die Cholsäure die Glykogenbildung in der Leber; und zwar wird der Glykogengehalt der Leber durch die Zufuhr von Cholsäure durchschnittlich um 0.94% gesteigert. Die Glykogenbildung wird also durch Verabreichung von Cholsäure mit Zucker durchschnittlich um 49.7% vermehrt.

Aus diesen Ergebnissen sieht man, dass die Glykogenbildung sowohl aus Fruchtzucker als auch aus Traubenzucker bei Zufuhr von Cholsäure in gleichem Grade gefördert wird, während die Glykogenbildung aus Traubenzucker hinter der aus Fruchtzucker sehr weit zurücksteht, und zwar sowohl bei Zufuhr des Zuckers sowohl ohne als auch mit Cholsäure.

Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Resultaten bei den Zuckerausscheidungsschwellenversuchen überein, bei welchen gefunden wurde, dass die Ausscheidungsschwelle des Fruchtzuckers im Harn viel niedriger liegt als die des Traubenzuckers.

TABELLE II. (Glukose)

( A )

Datum	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
	Vor	Nach dem Hunger			
15./Jun.	2550	2120	48	1.663	Glukose 3 g pro kg
"	2400	2100	43	1.975	
"	2270	1880	33	1.975	
16	2350	2050	39	2.113	
"	2400	2000	42	1.988	
"	1800	1500	34	1.725	
"	1870	1520	34	1.800	
Durchschnittswert				1.891	

( B )

Datum	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
	Vor	Nach dem Hunger			
18./Jun.	1950	1740	39	2.825	Glukose 3 g, Cholsäure 0.3 g pro kg
"	1880	1610	33	2.688	
"	2040	1700	38	2.825	
20	2070	1670	36	2.625	
"	2240	1910	44	2.949	
"	2350	2010	45	3.026	
"	1810	1580	38	2.878	
Durchschnittswert				2.831	

## 3. Versuch mit Mannose.

Durch die Versuche A und B der Tabelle III wird gezeigt, dass bei Zufuhr von Mannose allein der Glykogenegehalt der Leber durchschnittlich 1.809% beträgt, während er bei der gleichzeitigen Zufuhr mit Cholsäure durchschnittlich mit 2.641% gefunden wird.

Das Glykogen der Leber wurde bei Zufuhr von Cholsäure durchschnittlich um ungefähr 0.832% vermehrt gefunden. Demnach fördert die Cholsäure die Glykogenbildung durchschnittlich um ungefähr 45.9%.

Aus diesen Daten ergibt sich, dass die Glykogenbildung der Leber aus *d*-Mannose durch die Zufuhr von Cholsäure genau so gefördert wird, wie die aus *d*-Fruktose und *d*-Glukose.

Diese Glykogenbildung der Leber aus Mannose sowohl mit als auch ohne Zufuhr von Cholsäure steht hinter der aus *d*-Glukose und *d*-Fruktose weit zurück.

Unter den oben erwähnten Zuckerarten ist der Fruchtzucker der beste Glykogenbildner, auf welchen zuerst *d*-Glukose, dann *d*-Mannose folgt.

In derselben Reihenfolge fördert die Cholsäure die Glykogenbildung.

TABELLE III. (Mannose)

( A )

Datum	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
	Vor	Nach dem Hunger			
25./Jun.	2700	2360	51	1.988	Mannose 3 g pro kg
"	2250	1900	43	1.975	
"	1830	1560	34	1.663	
"	2100	1750	47	1.800	
26	2000	1750	41	1.538	
"	2000	1620	31	1.725	
"	2050	1660	35	1.975	

Durchschnittswert 1.809

( B )

Datum	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
	Vor	Nach dem Hunger			
27./Jun.	2090	1780	34	2.488	Mannose 3 g, Cholsäure 0.3 g pro kg
"	1920	1540	33	2.613	
"	1890	1520	32	2.625	
"	1980	1650	41	3.025	
28	1850	1510	33	2.763	
"	1980	1790	38	2.613	
"	2120	1870	35	2.363	

Durchschnittswert 2.641

#### 4. Versuch mit Galaktose.

Aus der Tabelle IV ist ersichtlich, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Galaktose allein durchschnittlich 1.545% und bei einer solchen mit Cholsäure durchschnittlich 2.193% beträgt.

Demnach fördert die Cholsäure die Glykogenbildung aus *d*-Galaktose in der Leber durchschnittlich um 0.648%. Der Glykogengehalt der Leber wird also durch Zufuhr von Cholsäure um 42.0% vermehrt.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Glykogenbildung fördernde Wirkung der Cholsäure unter den Zuckerarten: *d*-Glukose, *d*-Fruktose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose am stärksten bei Fruktose auftritt, dann immer mehr abgeschwächt bei *d*-Glukose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose.

Die Glykogenbildung, die durch die 4 Zuckerarten hervorgerufen werden kann, ist bei Fruktose am deutlichsten; darauf folgen dem Bildungsgrad nach: *d*-Glukose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose.

Die Frage, ob diese die Glykogenbildung fördernde Eigenschaft der Gallensäure durch die Vermehrung der OH-Ionen oder durch die Förderung der Phosphorierung bedingt ist, steht noch offen.

Mir scheint diese Eigenschaft der Gallensäure durch die Vermehrung der OH-Ionen bedingt zu sein, weil einerseits sich Phosphorsäure und Calcium in der Galle des Hundes durch Zufuhr von Gallensäure stark vermehren, wie Kawada (1930) bewiesen hat, andererseits pH der Galle des Hundes bei Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird, wie schon Ito (1930) in seinem Experimente beobachtet hat.

Auch muss man berücksichtigen, dass die Gallensäure den Nucleinstoffwechsel und die Nucleasewirkung fördert.

Es scheint mir, dass diese Wirkung der Gallensäure die Vermehrung der Phosphorsäure hervorruft, indem durch sie die OH-Ionen in der Leber gesteigert werden.

TABELLE IV. (Galaktose)

( A )

Datum	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
	Vor dem	Nach Hunger			
2./Apr.	2340	2000	43	1.725	Galaktose 3 g pro kg
„	2320	2040	51	1.600	
„	2360	2080	44	1.413	
„	2410	2030	47	1.535	
„	2260	1950	46	1.413	
7./Jun.	1950	1650	39	1.656	
„	2300	1750	36	1.474	
Durchschnittswert				1.545	

( B )

Datum	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	%	Bemerkungen
	Vor dem	Nach Hunger			
4./Apr.	2230	2000	43	2.238	Galaktose 3 g, Cholsäure 0.3 g pro kg
„	2310	2040	40	2.032	
„	2280	2010	48	2.075	
„	2310	2080	51	2.593	
„	2280	1970	48	2.091	
21./Jun.	2400	2090	43	2.025	
2./Jul.	1930	1570	37	2.300	
Durchschnittswert				2.193	

## ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Glykogenbildung aus Monosacchariden bei hungernden Kaninchen tritt in folgender der Glykogen-Bildungskraft entsprechenden Reihe auf: *d*-Fructose, *d*-Glukose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose.

2. Diese in der Reihe absteigende Glykogenbildung in der Leber wird durch Zufuhr von Cholsäure durchschnittlich um 42.0–52.0% gesteigert.

3. Bei Fruktose, sowohl mit als auch ohne Zufuhr von Cholsäure, tritt die Glykogenbildung am stärksten hervor; auf diese folgen dem Grad ihrer Bildungskraft nach: *d*-Glukose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose.

4. Aus den Daten geht hervor, dass die Herabsetzung der Zuckerausscheidungsschwelle der verschiedenen Zuckerarten (*d*-Fruktose, *d*-Glukose, *d*-Mannose und *d*-Galaktose) im Harn bei Zufuhr von Cholsäure auf der dadurch geförderten Glykogenbildung beruht.

## LITERATUR.

- Bleyer, B. u. Schmidt, H. (1923): Biochem. Zeitschr., **135**, 546.  
 " " " **138**, 119.  
 " " " **141**, 278.  
 Fuzita, S. (1930): Arb. med. Univ. Okayama, **2**, 152.  
 Hatakeyama, T. (1928): Journ. of bioch., **8**, 371.  
 " (1927): " **8**, 261.  
 Ito, T. (1930): Arb. med. Univ. Okayama, **2**, 103.  
 Iwasaki, K. u. Mori, M. (1926): Praxis des Physiol. chem. Kursus nach Sudo. 11 Aufl. 334.  
 Karasawa, R. (1926): Journ. of bioch., **6**, 139.  
 " (1927): " **7**, 145.  
 Kawada, Y. (1930): noch nicht veröffentlicht.  
 Okamura, Takeji (1928): Journ. of bioch., **8**, 391.  
 Sekitoo, T. (1929): Journ. of bioch., **11**, 251.  
 Voit, C. (1892): Zeitschr. f. Biolog., **28**, 245.  
 Weinland, E. (1900): Zeitschr. f. Biolog., **38**, 374.



## ÜBER TAUROISOLITHOCHOLSÄURE AUS HÜHNERGALLE.

VON

TADAO HOSIZIMA, HIROSI TAKATA,  
ZIRO URAKI UND SIGETOSI SIBUYA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama.  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 27. September 1930.)

Nach den Angaben von Heinz und Wislicenus (1859) und Otto (1869) ist der Hauptbestandteil der Gänsegalle die Taurochenocholsäure, die durch Lauge in Taurin und Chenocholsäure gespalten wird. Die Taurochenocholsäure soll nach ihnen die Formel  $C_{29}H_{49}NSO_6$  besitzen und die Chenocholsäure die Formel  $C_{27}H_{44}O_4$  haben.

Dabei konnten sie aber kristallisierte Taurochenocholsäure nicht erhalten.

Bei der Darstellung der Taurochenocholsäure aus Gänsegalle haben Heinz und Wislicenus und Otto gefunden, dass ausser der Taurochenocholsäure noch eine kleine Menge von einer in perlmutterglänzenden sechseitigen Täfelchen kristallisierenden Substanz in der Gänsegalle enthalten ist, welche in Alkohol und Aether leicht löslich ist und Pettenkofer'sche Reaktion ergibt. Heinz und Wislicenus und Otto haben angenommen, dass die kristallisierte Säure eine Art von Paraglykocholsäure, Parataurochenocholsäure oder eine neue, der Gänsegalle eigentümliche Säure ist.

Nach Otto soll der aus Alkohol umkristallisierte glänzende Kristall bei  $198^{\circ}C$  schmelzen und die Säure wurde von ihm als Parataurochenocholsäure bezeichnet. Seitdem blieb die Untersuchung dieser Gallensäure ganz dahingestellt. Im Jahre 1924

haben Wieland und Reverey entdeckt, dass die Menschengalle ausser Cholsäure und Desoxycholsäure eine dritte Säure, die Anthrodesoxycholsäure ( $C_3$  und  $C_{13}$ ) enthält, welche mit der von Windaus, J. Bohne und E. Schwarzkopf (1924) und von Yonemura (1926) beschriebenen, aus der Gänsegalle und Hühnergalle dargestellten Chenodesoxycholsäure und Gallodesoxycholsäure identisch ist.

Durch die Untersuchungen von Wieland und Windaus wurde klargestellt, dass die Chenochohlsäure  $C_{27}H_{44}O_4$  von Heinz und Wislicenus und Otto eine Art der Desoxycholsäure, Cheno-desoxycholsäure  $C_{24}H_{40}O_4$  ( $C_3$  u.  $C_{13}$ ) ist. Nach der zur Darstellung der Taurocholsäure und Taurocholeinsäure benutzten Methode von Hammarsten (1904–05) haben wir durch Zersetzung des Eisen-niederschlag mit Soda aus der Hühnergalle einen neuen perl-mutterglänzenden durchsichtigen Tafelkristall erhalten. Aus verdünntem Alkohol kristallisiert er in durchsichtigen, mit zackigen Rändern versehenen Tafeln.

Er ist in Alkohol, Aceton und Eisessig leicht löslich, aber in Wasser, Aether und Petrolaether, und Chloroform unlöslich und zeigt Pettenkofersche Reaktion. Er ist stickstoff- und schwefelhaltig und schmilzt bei  $210^{\circ}$ – $211^{\circ}C$ . Seine spezifische Drehung zeigt  $[\alpha]_D^{21} = +65,74$ .

Durch Lauge wird er in Taurin und eine Art von Lithocholsäure  $C_{24}H_{40}O_3$  gespalten. Wir bezeichnen diese als Isolithocholsäure.

Nach den obigen Daten und nach seiner Analyse ist der Kristall eine neue gepaarte Gallensäure, Tauroisolithocholsäure.

Die Lithocholsäure wurde schon von H. Fischer (1911) aus Rindergallenstein dargestellt. Er hat die Zusammensetzung als  $C_{24}H_{40}O_3$  angegeben.

Danach haben sie Wieland und seine Schüler (1920, 1925) aus Rinder- und Menschengalle isoliert und festgestellt, dass die Lithocholsäure eine Monoxycholansäure ist, die die sekundäre Alkoholgruppe in Stellung 7 des ersten Ringes trägt. Sie schmilzt

bei 186°C und zeigt eine spezifische Drehung von  $[\alpha]_D^{19} = +23,33$   
Fischer gibt eine spezifische Drehung von  $[\alpha]_D^{20} = +32,14$  an.

Unsere Isolithocholsäure hat denselben Schmelzpunkt, aber eine ganz andere höhere spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20} = +94,30$ .

Sie kristallisiert in langen Nadeln, Lithocholsäure dagegen in hexagonalen Blättchen, aus Alkohol.

Nach diesen Befunden ist es höchst wahrscheinlich, dass die sog. Parataurochenocholsäure von Heinz, Wislicenus und Otto eine Tauroisolithocholsäure ist.

### Experimenteller Teil.

Durch Alkoholzusatz schleimfrei gemachte Hühnergalle wird auf dem Wasserbade bis zum ursprünglichen Volumen 1000 cem eingedampft.

Dann wird sie mit einer 5 %igen Eisenchloridlösung versetzt, bis in der sauer gewordenen Lösung keine Fällung mehr entsteht, und filtriert. Der Eisenniederschlag wird mit warmer Sodalösung zersetzt. Das Filtrat wird eingedampft, der Rückstand wird mit Alkohol extrahiert.

Die alkoholische Lösung wird mit Tierkohle entfärbt und eingedampft. Der Rückstand wird nun in alkoholischer Lösung mit Schwefelsäure zerlegt und mit Äther versetzt. Dann fällt ein flockiger Niederschlag aus, welcher abfiltriert wird.

Dieser Niederschlag wird in verdünnter Sodalösung gelöst und unter Zusatz von Salzsäure und Aether allmählich angesäuert und geschüttelt. Der ausgefallene Niederschlag wird aus verdünntem Alkohol mehrmals umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 2,13 g.

Der Kristall zeigt perlmutterglänzende, durchsichtige, mit Zickzack-Rändern versehene Tafeln.

Er ist in Alkohol, Eisessig und Aceton leicht löslich, aber nicht in Wasser, Petroläther, Äther und Benzol, und er ergibt Pettenkofersche Reaktion. Er schmilzt bei 210°–211°C.

Die in Essigsäureanhydrid suspendierte Substanz wird bei Hinzufügen von konzentrierter Schwefelsäure rasch violettrot, dann

dunkelrot und grün. Die spezifische Drehung ist für die 0,54%ige Lösung in absolutem Alkohol:

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{100 \times 0,71}{0,54 \times 2} = + 65,74$$

Analyse:

- 1) 2,782 mg Substanzen ergaben 0,062 ccm N bei 22°C und 756 mm.
- 2) 2,860 mg Substanzen ergaben 0,065 ccm N bei 22°C und 756 mm.

Ber. f. $C_{23}H_{39}OCO-NH-CH_2-CH_2-SO_3H$	2,897 % N
Gef.	2,57 % N
„	2,62 % N

(Schoeller)

0,1008 g Substanz wurde in 5 %iger Natronlauge gelöst und 24 Stunden lang unter Rückfluss gekocht.

Beim Abkühlen der Lösung erstarrte sie zu einem dicken Kristallbrei, der abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen wurde.

Sie kristallisierte in prächtigen rosettenförmigen Nadeln. Dieses Natriumsalz wurde unter Erwärmen durch Zusatz von Bariumchloridlösung in Bariumsalz umgewandelt. Es kristallisierte jedoch nicht aus verdünntem Alkohol, obwohl die Chenodesoxycholsäure als Bariumsalz gut kristallisiert hatte.

Daher wurde die alkoholische Bariumsalzlösung durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und abgesaugt.

Der Niederschlag wurde aus verdünntem Alkohol umkristallisiert. Nun schied sich eine in prächtigen langen Nadeln kristallisierende Masse ab.

Der Kristall schmilzt bei 185°C. Die spezifische Drehung ist für die 0,228 %ige Lösung in absolutem Alkohol

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{100 \times 0,43}{0,228 \times 2} = + 94,30$$

Der Kristall ist in Wasser und in Petroläther unlöslich, aber in Alkohol und in Aceton leicht und in Äther und in Benzol ziemlich gut löslich.

Der Bruchteil eines Milligramms, in wenig Essigsäureanhydrid gelöst, gibt mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure sofort eine tief kirschrote Färbung, die nach einigem Stehen in Dunklrot übergeht.

#### Analyse:

4,640 mg : 12,94 mg CO<sub>2</sub> und 42,4 mg H<sub>2</sub>O

4,900 mg : 13,65 mg CO<sub>2</sub> und 4,40 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub> Ber. C 76,53 % H 10,71 %

Gef. C 76,08 % H 10,22 %

„ C 75,99 % H 10,04 %

(Schoeller)

Die obigen Daten zeigen, dass die hier isolierte Gallensäure eine Art von Lithocholsäure ist. Wir nennen sie Isolithocholsäure. Sie soll noch weiter konstitutionell bearbeitet werden.

Aus der von Gallensäure befreiten Flüssigkeit der verseiften Mutterlauge wurde nach der Methode von Salkowski der Kristall in langen Prismen erhalten, der in Wasser leicht, aber in absolutem Alkohol nicht löslich ist und bei 298°C schmilzt. Er ist schwefelhaltig. Hinsichtlich seiner Eigenschaften stimmt er mit dem Taurin überein.

Aus diesen Daten geht hervor, dass die Hühnergalle eine neue Gallensäure: Tauroisolithocholsäure, enthält.

#### LITERATUR.

Fischer, H. (1911): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **73**, 234.

Hammarsten, O. (1904/5): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **43**, 127.

Heinz u. Wisliciens (1859): Pogg. Ann., **108**, 547.

Otto, R. (1869): Ann., **149**, 185.

Wieland, H. u. Weyland, P. (1911): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **110**, 234.

Wieland, H. u. Reverey, G. (1924): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **140**, 186.

Wieland, H. u. Jacobi, R. (1925): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **148**, 1.

Windaus, A., Böhne, J. u. Schwarzkopf, E. (1924): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **140**, 177.

Yonemura, S. (1926): Journ. of Biochem., **6**, 287.



## EINE NEUE QUANTITATIVE MIKROBESTIMMUNGSMETHODE DER GALLENSÄUREN IN DER GALLE.

VON

SATOSU NAKAGAWA UND HOSABURO FUJIKAWA.

(Aus der II medizin. Klinik der kaiserlichen Universität zu Sapporo.  
Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.)

(Eingegangen am 27. September 1930.)

### I. EINLEITUNG.

Der eine von uns (Nakagawa, 1930) hat in einer früheren Mitteilung mit seinen Mitarbeitern eine neue quantitative Mikrobestimmungsmethode der Gallensäuren in der Galle veröffentlicht, welche darauf beruht, dass die Gallensäuren nach Herzfeld und Hämmerli (1924) nach 6 Minuten langem Kochen mit konzentrierter Phosphorsäure und Furfurol eine schöne grüne bis blaue Farbe zeigen. Diese Reaktion haben wir "Grüne Reaktion" genannt, um sie von der hier angegebenen Farbenreaktion zu unterscheiden. Weil aber an dieser Reaktion noch einiges zu wünschen übrig war, haben wir in dieser Arbeit versucht, die "grüne" Reaktion noch weiter zu verbessern.

Die Gallensäuren werden wie wohl bekannt in verschiedener Weise bestimmt: z. B. gravimetrisch, stalagmometrisch, gasometrisch (Foster und Hooper, 1919), durch Fluoreszenz (Raue) und endlich kolorimetrisch. Unter diesen Methode ist die eine, z. B. die gravimetrische, sehr schwer auszuführen und zwar nur mit einer sehr grossen Menge von Ausgangsmaterial; eine andere Methode ist sehr zeitraubend, und an einer dritten haften immer sehr grosse Fehler, oder sie bedeutet bloss eine Schätzung des Gallensäuregehaltes. Für uns Kliniker muss aber die Methode relativ einfach und nicht zu zeitraubend sein, während andererseits die möglichen Fehler verschwindend klein sein sollen. Aus diesen

Gründen haben wir eine kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode auszuarbeiten versucht.

## II. UNSERE EIGENE ROTE FARBENREAKTION.

Die Farbenreaktionen der Gallensäuren sind als die Pettenkofersche Reaktion und ihre Modifikationen wohl bekannt, aber diese Reaktionen reagieren mit einigen Ausnahmen nicht ganz spezifisch, indem sie mit sehr vielen anderen Substanzen ebenso positiv ausfallen. Dies war zuerst zu verbessern. Wir haben in diesem Sinne anstatt konzentrierter Schwefelsäure konzentrierte Phosphorsäure angewandt. Wenn man zu der wässrigen Lösung der gallensauren Salze verschiedene Mengen von Phosphorsäure und Furfurol zusetzt und das Gemenge im kochenden Wasserbade hält, so entwickeln sich sehr verschiedene Farben von rot bis blau. Nach zahlreichen Untersuchungen haben wir schliesslich die schön kirschrote Farbe gewählt, weil sie zur Farbenvergleichung am geeignetsten zu sein scheint.

Unsere Reaktion, vorläufig "rote Reaktion" genannt, führt man folgendermassen aus: Zu 0,5 ccm einer wässrigen Lösung der gallensauren Salze fügt man 2 ccm der konzentrierten Phosphorsäure (89% Merck) und zwei Tropfen der absolut-alkoholischen Furfurollösung (0.6%) hinzu und hält das Reagenzglas in einem vorher kräftig kochenden Wasserbade genau zwei Minuten; so entwickelt sich eine schöne rote Farbe. Das Reagenzglas wird nun sogleich eine Minute lang im Leitungswasser abgekühlt, und man vergleicht schnell mit der Standardfarblösung mittelst Autenriethkolorimeters. Die Versuchsbedingungen müssen immer streng gleich beibehalten werden; und deswegen darf man nicht beliebige Pipetten, sondern nur immer die gleichen in Gebrauch nehmen, um die Phosphorsäure und Furfurollösung abzupipettieren. Das Wasserbad muss vorher ganz kräftig kochend sein. Wenn man diese Bedingungen genau gleich beibehält, so bekommt man dieselben Werte, obwohl Phosphorsäure besonders schwer abzupipettieren ist. Die entstandene Farbe bleibt ziemlich lange fast

konstant, nimmt aber in Zimmertemperatur allmählich an Intensität zu und ausserdem einen violetten Ton an.

Die Standardfarblösung, welche sich sehr haltbar bewies, besteht aus einem Gemisch von Scarlet in Sublimatlösung und Kalium bichromatum. Man bereite die Standardfarblösung in folgender Weise: erste Lösung: 0.01 Scarlet,  $\text{HgCl}_2$  1 g Aqua dest. ad 100 cem; zweite Lösung: 1% wässrige Kaliumbichromatlösung. Zu 5 cem der ersten Lösung und 1,5 cem der zweiten füge man 30 cem Aqua destillata hinzu und fülle mit dieser Lösung den Keil des Autenrieth-Kolorimeters.

Die rote Farbe ist nach unseren Erfahrungen ganz proportional der Menge der gallensauren Salze innerhalb einer Grenze zwischen der 5 bis 20 mg-% igen Lösung derselben. Deswegen kann man sehr leicht eine gerade Linie herstellen, wie bei vielen anderen Bestimmungsmethoden durch Autenrieth-Kolorimeter. Unsere Methode ist zwar eine Mikromethode, weil man mit 0,5 cem einer 5 bis 20 mg-% igen Lösung, d. h. mit einer absoluten Menge von 0,025 bis 0,1 mg gallensaurer Salze arbeiten kann, aber nach unseren Erfahrungen ist es praktisch viel bequemer, mit einer Lösung von 10 bis 17 mg-% derselben zu arbeiten, weil die entstandenen Farben innerhalb dieser Grenzen am besten zu vergleichen sind.

Eine Standardlösung der Gallensäuren ist notwendig, wenn man eine Standardlinie zu bekommen wünscht. Die Gallensäuren und ihre Salze sind nun im allgemeinen, wie wohl bekannt, sehr schwer rein darzustellen. Wir haben z. B. mit einem Handelspräparat von Natrium glycocholicum Merck, gasometrisch nach Foster und Hooper gemessen, nur 50% der errechneten Werte erhalten. Dies ist besonders der Fall beim glycocholsauren Natrium. Deswegen haben wir zuerst den gasometrisch gefundenen Wert des glycocholsauren Natriums als Standardgallensäure gebraucht, es aber nachher bequemer gefunden, reines Natrium cholalicum oder Natrium taurocholicum als Standard zu wählen, welche wie unten beschrieben, viel leichter in reinem Zustande zu bekommen sind.

### III. UNSERE EXTRAKTIONSMETHODE DER GALLENSÄUREN AUS DER GALLE.

Wenn man die rote Reaktion an der Galle erhalten will, muss man einerseits die Gallenfarbstoffe vollkommen entfernen und anderseits die Gallensäuren quantitativ extrahieren. Für die Entfärbung der Galle sind schon lange verschiedene Adsorbentien in Gebrauch, unter denen Tierkohle hinsichtlich der Adsorptionskraft in erster Linie steht. Anderseits ist schon von vielen Seiten darauf aufmerksam gemacht worden, dass Tierkohle auch viel Gallensäuren in sich behält, was sie bisher für die quantitativen Bestimmungen der Gallensäuren ganz unbrauchbar machte. Diese Frage, einerseits die vollkommene Entfärbung der Galle und anderseits die quantitative Extraktion der Gallensäuren, war für die quantitative Bestimmung der Gallensäuren eine gefährliche Klippe, an der die zahlreichen Forscher immer gescheitert sind.

Nach Hugo Wit (1929) ist unter zahlreichen Adsorbentien die Entfärbungskraft der Tierkohle gegen Gallen am kräftigsten, aber wie schon oben gesagt, kommt dabei ein grosser Verlust an Gallensäuren zustande. Holzkohle soll viel schwächer aktiv sein, weswegen McClure, Vance und Greene (1925) mit Holzkohle und Kaolin Galle zu entfärben versucht haben mit angeblich gutem Resultate. Gregory und Pascoe (1929) haben diese Extraktionsmethode nachgeprüft, konnten aber die McClureschen Angaben nicht bestätigen, indem z. B. 80% der Gallensäuren verloren gingen. Holzkohle wurde aber auch von anderen Forschern gern gebraucht, z. B. neuerdings von Aldrich und Bledsoe (1928) und Marie Charlet (1929). Die ersteren Forscher haben nämlich bei der quantitativen Bestimmung der Gallensäuren im Blute Norit (aktivierte Holzkohle) zur Entfärbung angewandt und sollen keinen Verlust an Gallensäuren bemerkt haben. Die Methode wurde sogleich nachher von Marie Charlet nachgeprüft mit dem Ergebnisse, dass sogar Norit die Gallensäuren in merklicher Menge adsorbierte, und dass man deswegen Norit in möglichst minimaler

Menge anwenden müsste.

Nach diesen Angaben ist es klar, dass sowohl Tierkohle als auch Holzkohle zwar für die Entfärbung sehr geeignet, aber bei der quantitativen Bestimmung der Gallensäuren unbrauchbar sind.

Auch wir haben anfangs Tierkohle in Gebrauch genommen und immer einen grossen Verlust gefunden, sodass von einer quantitativen Bestimmung gar nicht die Rede sein konnte. Jedoch ist es uns nach langer Untersuchung endlich gelungen, einerseits mit Tierkohle Galle zu entfärben und anderseits zugleich die Gallensäuren praktisch vollkommen zu extrahieren.

Wir richteten zunächst unsere Aufmerksamkeit darauf, wie sich Tierkohle in alkalischem Medium verhält; sie ist ja bis jetzt von allen Forschern ausnahmslos bei der natürlichen, also ganz schwach alkalischen, Reaktion der Galle angewandt. Wenn nun die wässrige Lösung des Natrium glycocholicum vor dem Zusatze der Tierkohle mit Ammoniak stark alkalisch gemacht wurde, so konnten die Gallensäuren mit Alkohol praktisch vollkommen extrahiert werden; die Tierkohle hatte gar keinen Einfluss auf die Extraktion der Gallensäuren ausgeübt, wie aus Tabelle I ersichtlich ist.

TABELLE I.

Na. glycochol.	A.	58.8 mg %	70.0	69.5	93.5	90.0
	B.	54.6	69.2	68.0	92.0	89.0
	C.	38.7	57.2	62.4	56.0	—
Na. taurochol.	A.	364.0	153.0	74.5		
	B.	346.0	147.2	70.5		

A = Die Lösung direkt durch Farbenreaktion gemessen,

B = nach unserer Extraktionsmethode extrahiert und gemessen,

C = ohne Zusatz von Ammoniak extrahiert und gemessen.

Weiter haben wir dann untersucht, ob die zugefügten Gallensäuren nach Anwendung unserer Extraktionsmethode wieder ohne

Verlust gefunden werden. Und das war der Fall, wie aus Tabelle II klar ersichtlich ist.

TABELLE II.

	mg%	ccm	absolute Menge (mg)	errechnet (mg)	gefunden (mg)
Galle	150	0,2	0,300	0,575	0,580
zugefügte Na. glycoch.	55	0,5	0,275		
Galle	217	0,2	0,434	0,709	0,685
zugefügte Na. glycoch.	55	0,5	0,275		
Galle	314	0,5	1,570	1,740	1,750
zugefügte Na. glycoch.	85	0,2	0,170		
Galle	269	0,2	0,534	0,840	0,868
zugefügte Na. glycoch.	151	0,2	0,302		
Galle	120,8	0,5	0,604	0,942	0,950
Na. glycoch.	67,5	0,5	0,338		

Unsere Extraktionsmethode führt man in folgender Weise aus: Zu 0,5 ccm menschlicher Galle (Duodenalsaft) oder Hundefistelgalle (hier genügt schon 0,1 ccm wegen der starken Konzentration der Gallensäuren) fügt man erst 5 Tropfen Aqua ammoniae und etwa 10 ccm absoluten Alkohols zu und erwärmt; so scheidet sich koagulierbare Eiweissubstanz in feinen Flocken aus. Dann wird eine minimale Menge von Tierkohle zugefügt, welche nur soviel wie eben zur Entfärbung notwendig ist. Erwärmt man wieder, so bindet sich die Hauptmasse der Tierkohle an die Eiweissflocken; man kann dann die klare Schicht durchsehen. Man filtriert und wäscht den Bodensatz und das Filtrierpapier mindestens zweimal mit ebenso ammoniakalischem absolutem Alkohol. Das Filtrat und die

Waschflüssigkeit wird in eine Porzellenschale gebracht, auf dem Wasserbade bis zum Trocknen abgedampft, der Bodensatz mit Aether gewaschen und in aliquoter Menge von destilliertem Wasser aufgelöst, sodass die Lösung eben 10 bis 17 mg-% der Gallensäuren enthält. Dann ist die Lösung, wie oben beschrieben, für die rote Reaktion schon bereit. Aus der Standardlinie werden die mg-% der Lösung gefunden und mit der Verdünnungszahl multipliziert, auf welche Weise man die in der Galle enthaltenen Gallensäuren in Milligrammprozent finden kann.

Wie klar ersichtlich, ist unsere Extraktions- und kolorimetrische Methode äusserst einfach und in sehr kurzer Zeit auszuführen, Punkte, in denen die bis jetzt veröffentlichten Methoden gar nicht zu vergleichen sind. Hier ist noch hinzuzufügen, dass die eben angegebene warme Extraktion ganz gleiche Resultate wie die kalte gezeigt hat; aber die erstere ist wenigstens bei Gallen viel bequemer auszuführen. Der Kernpunkt unserer Extraktionsmethode liegt im Arbeiten im stark alkalischen Medium, dessen theoretische Grundlage in einer anderen Abhandlung genauer kritisiert werden wird.

An unserer Extraktionsmethode haften leider zwei unangenehme Phänome, welche, wenn auch nicht immer, so doch ab und zu die Manipulationen erschweren. Das eine ist, dass kleine Tierkohlepartikelchen durch das Filtrierpapier passieren, und das andere liegt darin, dass der Rückstand des Alkoholextraktes manchmal nur schwer in Wasser löslich ist.

Nach unseren Untersuchungen ist Tierkohle dann sehr leicht abzufiltrieren, wenn man in saurem (essigsauerm) Medium arbeitet, während sie in der ammoniakalischen Reaktion nur schwer abzufiltrieren ist. Wir konnten ferner bestätigen, dass die Tierkohlepartikelchen in saurem Medium unter dem Mikroskop ganz still stehend erscheinen, während sie in ammoniakalischer Reaktion lebhaft Molekularbewegungen zeigen. Neuerdings hat Wedekind (1929) Beobachtungen veröffentlicht, dass Tierkohlepartikelchen, Serum beigemischt, lebhaft Molekularbewegungen zeigen und

durch Filtrierpapier leicht passieren, während sie sich in Wasser ganz anders verhalten. Dieses Phänomen scheint aus unseren Beobachtungen teilweise so erklärt werden zu können, dass das Serum ganz schwach alkalisch reagiert. Die unangenehme Erscheinung ist aber leicht zu überwinden, wenn man ausser Ammoniak noch einen Tropfen 3%iger Natriumkarbonatlösung hinzufügt.

Den zweiten Nachteil unserer Extraktionsmethode beobachtet man nur ausnahmsweise bei menschlichem Duodenalsaft. Der Rückstand des Alkoholextraktes scheint in diesen Fällen nicht als gallensaures Natrium, sondern wahrscheinlich durch beigemischten Magensaft oder andere Komponenten als freie Gallensäure vorhanden zu sein, wodurch die Glykocholsäure wasserunlöslich wird. Dieser Nachteil kann ebenso leicht aufgehoben werden, indem man ausser Ammoniak einen Tropfen einer 3%igen Natriumkarbonatlösung zufügt.

Wie aus der Tabelle (III) ersichtlich ist, sind die gefundenen Werte der Gallensäuren bei schwer wasserlöslichem Alkoholextrakt zu niedrig, während sie bei Zusatz von Natriumkarbonat die vollen Werte zeigen.

Durch diesen Zusatz einer kleinen Menge von Natrium carbonicum konnte man also jeden Nachteil unserer Extraktionsmethode aufheben. Aber diese kleine Manipulation ist nur in Ausnahmefällen notwendig; man kann fast immer ohne Zusatz von Natrium carbonicum arbeiten, wenn man etwas geschickt geworden ist, die Tierkohle vollkommen abzufiltrieren.

#### IV. UEBER DIE SPEZIFITÄT UNSERER REAKTION.

Die grüne Reaktion der ersten Mitteilung ist von ganz spezifischer Natur; was nun die Spezifität der roten Reaktion anbelangt, so untersuchten wir unsere Reaktion mit verschiedenen Pettenkofer-positiven Substanzen. Natrium oleinicum, Lecithin und Alkohol-Äther-Extrakte aus Kaninchengehirnen verhalten sich in wässrigen Lösungen resp. Emulsionen gegen unsere Reaktion voll-

TABELLE III.

Menschlicher Duodenalsaft je 0,5 cem;

Alkohol zur Extraktion je 15 cem.

	NH <sub>4</sub> OH (gtt)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (gtt)	Tierkohle	glycoch. na. mg.-%	Tierkohle i. Filtrat	Rückstand löslich
I	je	0	je ca. 10 mg	188.0	+	schwer
		5 % 1		358.0	—	leicht
		2		364.0	—	leicht
	5	3		358.0	—	leicht
		4		358.0	—	leicht
II	5	0	beliebig	58.0	+	leicht
	0	0		52.4	+	„
	0	5 % 2		56.0	—	„
	5	„ 1		57.0	—	„
	5	3 % 1		58.0	—	„
III	5	0	beliebig	47.5	+	schwer
	5	3 % 1		68.5	—	leicht
	5	„ 1		67.5	—	„
IV	5	3 % 1	beliebig	182.0	—	leicht
	5	„ 1		182.0	—	leicht
	5	0		128.8	+	schwer

kommen negativ, während sie gegen Pettenkofer stark positiv reagieren. Amylalkohol zeigt dagegen sogar mit nur einem Tropfen ganz gleiche Farbe wie die Gallensäuren. Mit Cholesterin in wässriger Suspension fällt die Reaktion vollkommen negativ aus, während sie oberhalb 0.25%, aus einer 1%igen absolutalkoholischen Lösung mit Wasser hergestellt, positiv ausfällt. Das schadet aber praktisch nichts; denn Amylalkohol kommt in der Galle nicht in Betracht und Cholesterin ist in der Galle kaum so gross enthalten, zumal da unsere Reaktion in mehrfacher, oder über zehnfacher Verdünnung ausgeführt wird.

TABELLE IV.

	errechnet mg %	gefunden mg %	%	Durchschnitt
Cholsaures Na (Böhringer)	14	14.0	100	99 %
	10	9.8	99	
		10.0		
	8	7.7	97	
Desoxychols. Na (Böhringer)	50	11.3	22.6	22.7 %
	100/3	6.9	22.9	
	100/3	6.9	22.9	
Dehydrochols. Na (Böhringer)	100	39.9	39.9	39.9 %
Taurochols. Na (Merek)	20	20.0	100	100 %
	10	10.0	100	

Aus diesen Gründen kann man unsere Reaktion praktisch als spezifisch brauchbar betrachten.

Unsere Reaktion scheint, wie oben erwähnt, eine Reaktion gegen Cholsäure und ihre Verbindungen zu sein. Deswegen haben wir weiter untersucht, wie sich andere Gallensäuren verhalten.

Aus der Tabelle IV. ist leicht ersichtlich, dass Natrium cholalicum und Natrium taurocholicum fast 100% der errechneten Werte zeigen, während Desoxycholsäure und Dehydrocholsäure viel schwächer reagieren. Wir können aber auf Grund dieser Resultate nicht entscheidend aussagen, dass die letzteren zwei Gallensäuren immer in diesen Prozentsätzen reagieren; denn Decholin, welches aus dehydrocholsaurem Natrium bestehen soll und klinisch intravenös gebraucht wird, verhält sich gegen unsere Reaktion vollkommen negativ. Daraus hegen wir den Verdacht, dass unsere Präparate von Natrium dehydrocholicum und desoxycholicum vielleicht nicht chemisch rein waren, sondern dass ihnen Natrium cholalicum beigemischt war. Die Frage bedarf noch weiterer Untersuchung.

## V. VERHALTEN GEGEN GALLE VERSCHIEDENER TIERE.

Um die Brauchbarkeit unserer Mikromethode zu beurteilen, muss man die Reaktion mit anderen verlässlichen Methoden genau vergleichen. Dies wurde in unserem Laboratorium in ausgedehnter Weise ausgeführt; die genauen Resultate werden in einer anderen Arbeit behandelt. Hier sei nur kurz gesagt, dass man bei menschlichem Duodenalsaft und bei Hundegalle sehr befriedigende Werte bekommen kann, während die Methode bei Kaninchengalle fast immer zu niedrige Werte zeigt. Das kommt nach unserer Meinung daher, dass in der Kaninchengalle sehr viel Desoxycholsäure enthalten ist, welche sich gegen die Reaktion negativ verhält.

Wir können bei unserer Methode mit einer kleinen Menge von Galle (bei menschlicher Galle 0,5 ccm, bei Hundegalle nur 0,1 ccm) arbeiten, und zwar in sehr kurzer Zeit. Die Gallensäurenbestimmung galt bis jetzt als eine der schwierigsten, oder am meisten zeitraubenden Bestimmungen auf biochemischem Gebiete; jetzt ist diese Schwierigkeit mit unserer Methode überwunden. Man kann z. B. bei Gallengangfistelhunden ausgedehnte Serienversuche in wunderbar kurzer Zeit ausführen, was früher nur als Traum galt.

## VI. SCHLUSSFOLGERUNG.

1. Hier ist eine neue kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode der Gallensäuren in menschlicher und Hundegalle angegeben, wobei man anstatt konzentrierter Schwefelsäure konzentrierte Phosphorsäure und Furfurol anwendet. Diese Reaktion wird vorläufig "Nakagawasche rote Reaktion" genannt.

2. Die "rote Reaktion" ist wahrscheinlich eine Cholsäurereaktion; Desoxycholsäure und andere Gallensäuren reagieren nicht oder viel schwächer als die Cholsäure oder ihre gekuppelten Formen.

3. Man kann bei der alkoholischen Extraktion der Gallensäuren aus Galle Tierkohle ruhig anwenden, wenn die Galle vorher mit Ammoniak stark alkalisch gemacht ist.

4. Wenn man ausser Ammoniak nur eine kleine Menge von Natrium carbonicum zusetzt und extrahiert, so wird die Abfiltration von Tierkohle sehr leicht, und der sonst ab und zu schwer wasserlösliche Rückstand des Alkoholextraktes immer sofort wasserlöslich.

5. Die "rote Reaktion" ist im praktischen Sinne eine spezifische Reaktion der Gallensäuren. Natrium oleinicum, Cholesterin, Lecithin und Alkohol-Äther-Extrakte aus Kaninchen-Gehirnen verhalten sich in wässriger Lösung resp. Suspension vollkommen negativ. Nur Amylalkohol reagiert sogar mit einer sehr kleinen Menge positiv.

6. Die Methode zeigt bei menschlicher und Hundegalle voll befriedigende Resultate, während sie bei Kaninchengalle zu niedrig ausfällt.

#### LITERATUR.

- Aldrich & Bledsoe (1928): Studies in the metabolism of the bile acids, *J. biol. chem.*, **77**, 519.
- Charlet Marie (1929): Der Gehalt des Blutes an Gallensäuren unter verschiedenen physiologischen Bedingungen, *Biochem. Zs.*, **210**, 42.
- Foster und Hooper (1919): Metabolism of bile acids, *J. of biol. chem* **38**, 355.
- Gregory and Pascoe (1929): The quantitative Determination of bile acids by means of a new colorimetric reaction and monochromatic light, *J. of biol. chem.* **83**, 35.
- Herzfeld und Hämmerli (1924): Die Galle im Stoffwechsel, *Schweiz. med. W.*, 141.
- McClure, Vance und Greene (1925): *Boston med. and surg. J.* **192**, 431, zit. *M. m. W.* 1925, 1485.
- Nakagawa, S., Kumekawa, H. und Gondaira, T. Studien über Gallensäuren. Eine kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode der Gallensäuren in der Galle, *Hokkaidoigakuzasshi*, 8. Jg. Nr. 1.
- Wedekind (1929): Intravenöse Kohleinjektion zur Behandlung der Lungentuberkulose, *D. A. f. kl. Med.*, **163**, 202.
- Hugo Wit (1929): Die physikalische Entfärbbarkeit der Galle, *Bioch. Zs.*, **207**, 141.

## THE ELECTRODE POTENTIALS OF THE SILVER HALIDE ELECTRODES AGAINST A MIXTURE OF DIFFERENT HALIDE SOLUTIONS.

By

JUZABURO TANIDA.

*(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. Dr. R. Shoji, and from the physico-chemical Division of the Institute of Anatomy, Medical College of Kyoto. Director: Prof. Y. Katsu.)*

(Received for publication, September 29, 1930.)

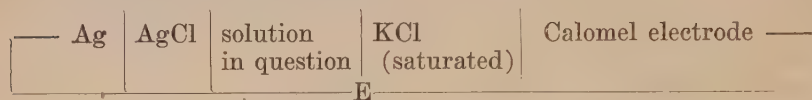
### INTRODUCTION.

It is a well known fact that the activity of the chlorine ions, i.e. the concentration of the active chlorine ions in a solution, can be estimated by the potentiometric method with the silver chloride electrode. Recently the method was precisely studied by Katsu, who pointed out that the method is also applicable to any kind of halogen ions when using the corresponding silver halide electrode. The theory of the method is that the solution is brought to a state of saturation with the corresponding silver halide, the solubility product of which is a constant at a given temperature, and thus the activity of the silver ions is inversely proportional to the halogen ion activity, which is the subject of the determination. The activity of the silver ion, in turn, is the decisive factor of the potential held by the silver electrode, which we can estimate by means of the usual potentiometry.

The theory is undoubtedly applicable to any solution containing only one kind of halogen ions. For a mixture of different halide solutions, however, it is not so simple, as the solubility product of each silver halide is different. Before proceeding on the theoretical considerations on this point, however, it seems to us to be more convenient to study the problem experimentally.

## METHODS.

In order to estimate the chlorine ion activity of a solution, a cell is prepared with it as follows:



Its electromotive force,  $E$ , is measured at a constant temperature by the potentiometric method. Then we have

$$\frac{E_0 - E}{0.0001983 T} = -\log [Cl'] = pCl$$

where  $E_0$  is the normal electrode potential of the calomel electrode in use against the chlorine ion.

In order to determine the value of  $E_0$ , a similar cell is prepared with a standard solution of KCl in exactly 0.01 N, and its electromotive force,  $E'$ , is measured. The activity coefficient of this standard solution being 0.9226 after the Ghosh theory, we have

$$\frac{E_0 - E'}{0.0001983 T} = -\log (0.9226 \times 10^{-2}),$$

from which the value of  $E_0$  for the chlorine ion is calculated.

The same is applicable also for the bromine or iodine ions. The only difference is that the standard solution should be of KBr or KI respectively.

In practice we preferred a 0.1 N calomel electrode, and estimated its  $E_0$  for the halogen ions in question every day of the experiment, as the value varied, even though slightly, with the lapse of days, as will soon be reported in this Journal by Hiraki of our Institute who studied the problem precisely for the pH determination.

The details of the method and instruments were quite the same as those described by Katsu in 1927, who studied the method in our institute at that time. Readers are respectfully requested to

refer to his paper. Only a note is to be added here on the halidization of the silver-plated platinum electrode, i.e. covering the electrode with the required silver halide. Chloridization was carried out by electrolysis of 0.1 N KCl solution acidulated with a few drops of HCl. Bromidization or iodization was also attained by the same procedure with 0.1 N NaBr or 0.1 N NaI solution respectively. Ablation of the halide was easily accomplished by immersing the electrode in a KCN-solution of about 5–6% for several or several tens of minutes.

The first series of measurements were carried out at 18°C, the second at 25°C, the composite set of the cells being immersed in a water bath of that temperature, of which the deviations were limited within a scope of 0.1°C. In all experiments ten parallel estimates were made of which the mean values are given in the tables.

#### EXPERIMENTS.

Each of the three kinds of silver halide electrodes was immersed separately, either (a) in a solution of a different kind of K-halide, i.e., an AgCl-electrode in a KBr- or KI-solution; (b) in a solution containing two or three different K-halides; (c) in a solution of one K-halide and another K-salt, such as  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KClO}_3$ , or  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Each of the electrodes thus prepared was coupled with one and the same 0.1 N calomel electrode, and the potential of each set was measured.

In the first series of experiments, the concentration of each salt was preferred commonly as 0.1 N. A silver halide electrode was immersed in a solution of either the K-salt of the same halide alone or intermixed with another K-salt. The results are given in Table 1. Here we see that the potential of a cell is determined, not by the sort of halide on the electrode, but by the halide in the solution. When the solution contains only one sort of halide, the potential remains almost the same, the intermixture of  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KClO}_3$  or  $\text{K}_2\text{SO}_4$  reducing it slightly. When the solution contains KBr, the potential remains in a similar magnitude, and is not

markedly influenced by the intermixture of KCl or other salts except KI. When the solution contains KI, the potential is mainly determined by it, and the intermixture of other salts including KCl or KBr does not markedly change the potential.

TABLE 1. (18°C)

AgCl-electrode		AgBr-electrode		AgI-electrode	
solution	potential (millivolt)	solution	potential (millivolt)	solution	potential (millivolt)
0.1 N KCl	43.58	0.1 N KBr	194.64	0.1 N KI	417.00
{ 0.1 N KCl 0.1 N KBr	190.46	{ 0.1 N KBr 0.1 N KCl	192.82	{ 0.1 N KI 0.1 N KCl	416.06
{ 0.1 N KCl 0.1 N KI	413.29	{ 0.1 N KBr 0.1 N KI	412.60	{ 0.1 N KI 0.1 N KBr	415.76
{ 0.1 N KCl 0.1 N KNO <sub>3</sub>	42.12	{ 0.1 N KBr 0.1 N KNO <sub>3</sub>	192.49	{ 0.1 N KI 0.1 N KNO <sub>3</sub>	414.83
{ 0.1 N KCl 0.1 N KClO <sub>3</sub>	41.52	{ 0.1 N KBr 0.1 N KClO <sub>3</sub>	192.53	{ 0.1 N KI 0.1 N KClO <sub>3</sub>	414.93
{ 0.1 N KCl 0.1 N K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	41.36	{ 0.1 N KBr 0.1 N K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	192.61	{ 0.1 N KI 0.1 N K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	414.61

In general, the potential is determined by the halide of the largest molecular weight, and the intermixture of other salts, including the halides of smaller molecular weight, influence the potential to reduce it by only a few millivolts.

In order to confirm this conclusion, the second series of experiments was carried out, of which the results are summarized in Table 2. In the 1st part of this series, each 0.1 N solution of KCl, KBr and KI was examined with three sorts of silver halide electrodes, as well as with the blank silver electrode separately. The result verifies the fact that the potential was dependent merely on the solution. They gave ca. 45 millivolts for KCl, ca. 196 millivolts for KBr and ca. 419 millivolts for KI. Deviations according to different sorts of electrodes were observed, which, however, never exceeded 5 or 6 millivolts.

TABLE 2. (25°C)

Group of exper.	Solution				potentials (millivolt)			
	Solute	concentration			AgCl-electrode	AgBr-electrode	AgI-electrode	blank Ag-electrode
		KCl	KBr	KI				
I	KCl	0.1	—	—	45.35	57.28	45.19	43.47
	KBr	—	0.1	—	194.31	196.32	195.69	190.50
	KI	—	—	0.1	415.68	414.28	419.40	416.39
II a	KCl + KBr	0.2	0.1	—	189.29	192.84	192.28	191.20
		0.1	0.1	—	189.26	194.36	194.35	192.61
		0.05	0.1	—	191.41	194.55	194.94	191.18
		0.1	0.2	—	207.64	211.54	209.62	209.75
		0.1	0.1	—	191.62	194.40	193.41	192.38
		0.1	0.05	—	173.27	178.27	176.32	173.20
II b	KCl + KI	0.2	—	0.1	413.83	413.59	417.24	415.10
		0.1	—	0.1	414.83	413.81	416.71	415.04
		0.05	—	0.1	416.49	415.56	418.27	415.81
		0.1	—	0.2	433.25	433.01	434.28	434.41
		0.1	—	0.1	415.32	412.62	417.54	414.76
		0.1	—	0.05	398.92	392.56	400.68	396.76
II c	KBr + KI	—	0.2	0.1	416.58	413.12	415.65	415.52
		—	0.1	0.1	415.67	413.91	415.87	415.91
		—	0.05	0.1	415.61	415.02	417.27	414.36
		—	0.1	0.2	434.78	434.28	434.73	436.29
		—	0.1	0.1	415.83	413.89	417.60	416.30
		—	0.1	0.05	398.04	396.29	399.82	397.36
		—	—	—	—	—	—	—
III	KCl + KBr + KI	0.1	0.1	0.1	415.43	414.78	416.32	415.19

In Part II, both KCl and KBr were dissolved simultaneously in a solution, one of them being taken in a constant concentration, namely 0.1 N, while the other varied among 0.05, 0.1 and 0.2 N. In

every case the potential was determined mainly by the concentration of KBr, independently of the sort of electrode used. In other words, when the concentrations of KCl were varied from 0.05 N to 0.2 N, that of KBr being 0.1 N in all cases, the potentials were almost the same. When, however, the concentrations of KBr are varied, that of KCl being constant, the potentials varied with the former. Similar relations were observed with the solutions of KCl+KI as well as KBr+KI. In both cases the potentials were determined by the concentrations of KI alone.

In Part III, all three halides were dissolved simultaneously in a solution, the concentrations being commonly 0.1 N. The potentials were found to be the same as those of the simple solution of KI alone in the same concentration.

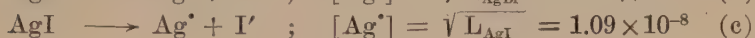
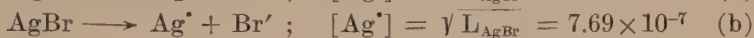
#### CONSIDERATIONS.

The results mentioned above are explainable by the fact that the potential is determined by the concentration of the halogen ion which has a smaller solubility product ( $L$ ) with Ag-ion. According to Landolt's Table, we have

$$\begin{aligned}
 L_{\text{AgCl}} = [\text{Ag}'] [\text{Cl}'] &= \begin{cases} 1.56 \times 10^{-10} & (\text{Goodwin}) \\ 1.99 \times 10^{-10} & (\text{Thiel}) \\ \text{mean} & 1.77 \times 10^{-10} \quad (\text{at } 25^\circ\text{C}) \end{cases} \\
 L_{\text{AgBr}} = [\text{Ag}'] [\text{Br}'] &= \begin{cases} 6.5 \times 10^{-13} & (\text{Thiel}) \\ 4.4 \times 10^{-13} & (\text{Goodwin}) \\ 5.1 \times 10^{-13} & (\text{Bodländer}) \\ 7.7 \times 10^{-13} & (\text{Hill}) \\ \text{mean} & 5.92 \times 10^{-13} \quad (\text{at } 25^\circ\text{C}) \end{cases} \\
 L_{\text{AgI}} = [\text{Ag}'] [\text{I}'] &= \begin{cases} 0.94 \times 10^{-16} & (\text{Goodwin}) \\ 1.1 \times 10^{-16} & (\text{Thiel}) \\ 1.5 \times 10^{-16} & (\text{Hill}) \\ \text{mean} & 1.18 \times 10^{-16} \quad (\text{at } 25^\circ\text{C}) \end{cases}
 \end{aligned}$$

When a silver halide comes into contact with water, it dis-

solves to establish a saturated solution, where the concentration of the silver ion is as follows:



When a blank silver electrode is immersed in water, a certain silver salt such as the oxide will dissolve into the fluid. For the silver oxide, the data are as follows:

$$L_{\text{AgOH}} = [\text{Ag}^{\bullet}] [\text{OH}'] = \begin{cases} 2.29 \times 10^{-8} & (\text{Noyes}) \\ 2.74 \times 10^{-8} & (\text{Britton}) \end{cases}$$

mean  $2.52 \times 10^{-8} \quad (\text{at } 25^{\circ}\text{C})$

and

$$[\text{Ag}^{\bullet}] = \sqrt{L_{\text{AgOH}}} = 1.59 \times 10^{-4} \quad (\text{d})$$

Of course it is not certain that the salt is an oxide, and accordingly further discussions concerning the blank silver electrode are useless.

Suppose any of these halide electrodes are immersed in a solution of 0.1 N KCl. The concentration of the active Cl-ion in it is

$$[\text{Cl}'] = 10^{-1} \alpha = 0.84 \times 10^{-1},$$

where  $\alpha$  is the activity coefficient of the Cl-ion, the numerical value of which is calculated after the Ghosh theory (Cp. Katsu's report, 1927, a). In this solution, it holds

$$[\text{Ag}^{\bullet}] = \frac{L_{\text{AgCl}}}{[\text{Cl}']} = \frac{1.77 \times 10^{-10}}{0.84 \times 10^{-1}} = 2.10 \times 10^{-9} \quad (\text{e})$$

This value of  $[\text{Ag}^{\bullet}]$  is smaller than any of the  $[\text{Ag}^{\bullet}]$  given above in (a), (b), (c) or (d), which applies to the saturation of the silver halide in pure water. Accordingly, when any one of the silver halide electrodes is immersed in a 0.1 N KCl solution, the Ag-ion coming from the electrode is precipitated by the Cl-ion in the solution, until the  $[\text{Ag}^{\bullet}]$  is reduced to the value given in (e).

When the concentration of KCl is 0.05, the  $[Ag^*]$  becomes  $4.06 \times 10^{-9}$ , which is yet smaller than the  $[Ag^*]$  given in (a), (b), (c) or (d).

With the solution containing 0.1 N KBr, the Ag-ion concentration becomes still smaller, namely,

$$[Ag^*] = \frac{L_{AgBr}}{[Br']} = \frac{5.92 \times 10^{-13}}{0.84 \times 10^{-1}} = 7.03 \times 10^{-12},$$

and with 0.1 N KI,

$$[Ag^*] = \frac{L_{AgI}}{[I']} = \frac{1.18 \times 10^{-16}}{0.84 \times 10^{-1}} = 1.40 \times 10^{-15}.$$

In every case the  $[Ag^*]$  in the solution is reduced to the least value given here; thus it is determined by the activity of the halogen ion, which has the least solubility product with the Ag-ion, which corresponds to that of the largest molecular weight.

It is reasonable to suppose that the same relations hold for the Hg-halide electrodes, so that any contamination of a calomel electrode liquid with bromide or iodide should strictly be avoided.

#### CONCLUSIONS.

The potential of a silver halide electrode, immersed in a solution containing halogen ions, against a calomel electrode, is determined mainly by the activity of the halogen ion of the largest molecular weight alone. Other halogen ions of smaller molecular weight as well as other anions than the halides are indifferent. The potential is the same whether AgCl-, AgBr- or AgI-electrode, or sometimes the blank silver electrode, is used. The facts are explainable by the relation of the solubility products of the silver halides.

#### REFERENCES.

- Katsu, Y. (1927: Journ. of Biophysics, **2**, 123.  
 Katsu, Y. (1927, a): ditto, **2**, 113.  
 Landolt-Börnstein, Physik-chem. Tabellen, 5. Aufl. II (1923) 1180-1181,  
 Erg. Bd. (1927) 662.

## STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

### **X. On the Adrenaline Content in Suprarenals and the Amount of the Adrenalin-like Substance in the Serum of Guinea Pigs Fed on a Vitamin C Free Diet.**

BY

SHINSUKE ÔHATA.

*(From the Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Jikei-Kwai Medical College. Director: Prof. T. Nagayama.)*

(Received for publication, October 7, 1930.)

Nagayama and Tagaya (1929) in our laboratory have published a paper on the lipoid metabolism in experimental scurvy, and they concluded that the fatty acid in the respective organs of scorbutic guinea pigs decreased in comparison with that of the control, but that the unsaponifiable substance contained was almost the same in all organs on both scorbutic and control sides, except for an extreme decrease in the suprarenals of scorbutic animals. Later Igarashi and Tagaya (1929) determined the cholesterol content in the suprarenals of scorbutic guinea pigs, and found that the reduction of the unsaponifiable substance in suprarenals was chiefly induced by the decrease of cholesterol. McCarrison (1919) reported that the adrenaline content in the suprarenals of scorbutic guinea pigs decreased. Nakauma (1920) obtained a similar result in guinea pigs fed merely on bean-curd refuse. S. Morikawa (1920) reported also that in Barlow's disease induced by feeding guinea pigs on mere bean-curd refuse, the suprarenals were enlarged and the chrom reaction of marrow substance was diminished. Mauriquand et Leulier (1925) reported that there can be seen a serious disturbance of cholesterol metabolism in suprarenals of scorbutic guinea pigs. It seems to me that the lack of vitamin C gives rise to some metabolic changes in suprarenals of guinea pigs. I also determined the adrenaline

content in suprarenals and adrenaline-like substance in the blood of scorbutic animals.

### I. EXPERIMENTAL METHODS.

The guinea pigs employed weighed from 400 to 550 gm. At first the animals were put in one cage together. Sherman's diet was given, besides the usual food, for several days. When the animals got used to Sherman's diet, they were separated into different metabolism cages. For one week, Sherman's diet and fresh radish juice were fed to each of them. Then the fresh radish was replaced by boiled radish for the scorbutic experiment.

For the determination of adrenaline content in suprarenals, Suto-Inoue's method (1926), and for adrenaline-like substance in serum, Chikano's method (1926) were used. To avoid the agitation of the animals, as much as possible, blood was drawn from the carotid artery and then the suprarenals were extirpated. The results are shown in the Tables Ia, Ib, II, III, IV, V and Fig. 1.

Figure 1.

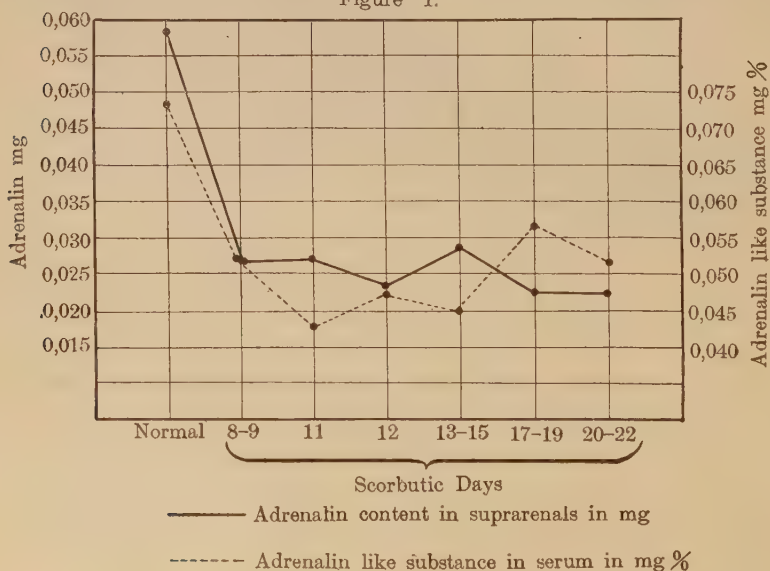


TABLE Ia. (Normal).

No.	Body Weight		Suprarenals				Adrenaline per kilo body weight	Autopsy findings
	Initial	Final	Weight	Weight per 100 gm. Body weight	Adrenaline			
	gm.	gm.	gm.	%	mg.	mg. %	mg.	
1	480	340	0.1666	0.0490	0.0489	29.351	0.1438	*
2	440	405	0.2401	0.0593	0.0678	28.196	0.1674	—
3	495	450	0.2765	0.0614	0.0645	23.327	0.1422	—
4	435	310	0.2292	0.0739	0.0588	25.654	0.1896	—
5	425	300	0.2325	0.0775	0.0571	24.559	0.1903	—
6	490	460	0.3562	0.0774	0.0480	13.476	0.1043	—
7	425	295	0.2646	0.0897	0.0649	24.565	0.2200	—
8	370	265	0.2719	0.1026	0.0517	19.014	0.1915	—
9	370	285	0.2372	0.0832	0.0511	21.543	0.1793	—
10	365	335	0.2765	0.0828	0.0723	26.148	0.2158	—
Maximum	495	460	0.3562	0.1026	0.0723	29.351	0.2200	
Minimum	365	265	0.1666	0.0490	0.0480	13.476	0.1043	
Average	429	344	0.2551	0.0757	0.0585	23.583	0.1748	

\* indicates that there is no scorbutic change.

TABLE Ib. (Normal).

No.	Body Weight		Serum		Autopsy findings
	Initial	Final	Adrenaline-like substance		
	gm.	gm.	mg. per 0.5 cc.	mg. %	
51	450	430	0.0720	14.400	—
52	500	480	0.0720	14.400	—
53	540	500	0.0680	13.600	—
54	530	460	0.0771	15.420	—
56	440	380	0.0943	18.860	—
57	480	420	0.0613	12.260	—
58	440	380	0.0463	9.260	—
60	520	510	0.0714	14.280	—
61	520	490	0.0967	19.340	—
Maximum	540	510	0.0967	19.340	
Minimum	440	380	0.0463	9.260	
Average	491	450	0.0732	14.646	

TABLE II.

No.	Scor- butic days	Body Weight		Suprarenals				Adrena- line per kilo body weight		Serum		Autopsy findings	Total diet ingested
		Initial	Final	Weight	Adrenaline		mg.	mg. %	mg. per 0.5 cc.	mg. %			
					%	mg.							
47	8	480	330	0.1726	0.0523	0.0273	15.817	0.0827	0.0650	13.000		118	
36	9	580	440	0.3501	0.0796	0.0265	7.569	0.0602	0.0390	7.800	++	125	
Average		530	385	0.2614	0.0660	0.0269	11.693	0.0715	0.0520	10.400	++		
43	11	450	340	0.2355	0.0693	0.0300	12.739	0.0882	0.0488	9.760	++	149	
38	11	580	480	0.4527	0.0943	0.0265	5.854	0.0552	0.0490	9.800	+	203	
41	11	440	320	0.3243	0.1013	0.0353	10.885	0.1103	0.0500	10.000	++	129	
50	11	420	370	0.2928	0.0791	0.0250	8.538	0.0676	0.0344	6.880	++	158	
40	11	490	380	0.2534	0.0667	0.0183	7.222	0.0482	0.0320	6.400	++	149	
Maximum		580	480	0.4527	0.1013	0.0353	12.739	0.1103	0.0500	10.000	++		
Minimum		420	320	0.2355	0.0667	0.0183	5.854	0.0482	0.0320	6.40	++		
Average		476	380	0.3117	0.0821	0.0270	9.048	0.0739	0.0428	8.568	++	148	
45	12	450	330	0.2706	0.0820	0.0273	10.089	0.0827	0.0390	7.800	++	181	
48	12	460	380	0.2336	0.0615	0.0240	10.274	0.0632	0.0611	12.220	++	157	
49	12	460	340	0.2292	0.0674	0.0182	7.941	0.0535	0.0420	8.400	++		
Maximum		460	380	0.2706	0.0820	0.0273	10.274	0.0827	0.0611	12.220	++		
Minimum		450	330	0.2292	0.0615	0.0182	7.941	0.0535	0.0390	7.800	++		
Average		457	350	0.2445	0.0703	0.0232	9.435	0.0665	0.0474	9.473	++		

Foot Note: The severity of autopsy findings such as hemorrhages and fragility of bones and looseness of teeth are indicated by—(not different from the normal), and +, ++, +++, for increasing degree of severity.

TABLE III.

No.	Scor- butie days	Body Weight		Suprarenals			Adrena- line per kilo body weight	Serum		Autopsy findings	Total diet ingested
		Initial	Final	Weight	Adrenaline			Adrenalin-like substance	mg. per 0.5 cc.		
					gm.	mg.					
44	13	440	380	0.2613	0.0688	0.0261	9.989	0.0350	7.000	+	103
26	14	430	350	0.2265	0.0647	0.0375	16.556	0.0350	11.000	+	129
29	14	410	300	0.2792	0.0931	0.0214	7.665	0.0340	10.800	+	120
30	15	470	300	0.3576	0.1192	0.0286	7.998	0.0360	7.200	+	96
Maximum		470	380	0.3576	0.1192	0.0375	16.556	0.0550	11.000	+	
Minimum		410	300	0.2265	0.0647	0.0214	7.665	0.0350	7.000	+	
Average		438	333	0.2812	0.0865	0.0281	10.552	0.0450	9.000	+	
27	17	540	440	0.2591	0.0589	0.0375	14.473	0.0830	16.600	+	238
20	19	500	320	0.3123	0.0976	0.0250	8.005	0.0600	12.000	+	168
23	19	450	310	0.3705	0.1195	0.0234	6.316	0.0480	9.600	+	184
14	19	450	290	0.3541	0.1910	0.0167	3.014	0.0263	5.260	+	125
19	19	380	210	0.3801	0.1810	0.0100	2.631	0.0476	13.260	+	128
Maximum		540	440	0.5541	0.1910	0.0375	14.473	0.0830	16.600		
Minimum		380	210	0.2591	0.0589	0.0100	2.631	0.0263	5.260		
Average		464	314	0.3732	0.1296	0.0225	6.388	0.0567	11.344		
15	20	490	250	0.4961	0.2255	0.0169	3.407	0.0768	11.940	+	114
21	21	400	270	0.2678	0.0992	0.0303	11.314	0.0613	12.260	+	159
11	22	480	300	0.3256	0.1085	0.0167	5.139	0.0358	7.160	+	150
16	22	410	250	0.3826	0.1530	0.0259	6.769	0.0487	9.740	+	193
Maximum		480	300	0.4961	0.2255	0.0303	11.314	0.0613	12.260	+	
Minimum		410	220	0.2678	0.0992	0.0167	3.407	0.0358	7.167	+	
Average		423	260	0.3680	0.1466	0.0225	6.655	0.0514	10.275	+	

TABLE IV.

No.	Fasted days	Body Weight		Suprarenals				Adrena- line per kilo body weight	Serum		Autopsy findings
		Initial	Final	Weight	Wt. per 100 gm. body wt.	Adrenaline		mg.	mg. per 0.5 cc.	mg. %	
		gm.	gm.	gm.	%	mg.	mg. %				
31	6	520	380	0.2783	0.0732	0.0450	16.169	0.1184	0.0522	10.440	-
32	6	510	420	0.3236	0.0771	0.0300	9.272	0.0714	0.0522	10.440	-
33	3	410	330	0.2154	0.0654	0.0409	18.944	0.1239	0.0290	5.800	-
34	3	370	310	0.2051	0.0662	0.0274	13.359	0.0884	0.0300	6.000	-
Maximum		520	420	0.3236	0.0732	0.0450	18.944	0.1239	0.0522	10.440	
Minimum		370	310	0.2159	0.0654	0.0274	9.271	0.0714	0.0290	5.800	
Average		453	360	0.2557	0.0705	0.0358	14.435	0.1005	0.0409	8.170	

## II. COMMENT ON THE RESULTS OF THE EXPERIMENT.

1. *Normal animal.*

As seen in Table Ia, the adrenaline content in suprarenals of normal animal varies widely, as is indicated by 0.0723 mg. in maximum and 0.0480 mg. in minimum, and 0.0585 mg. on an average; the percentage in milligram is from 13.476 to 29.351, and 23.583 in mean value. In this case guinea pigs were fed on Sherman's diet and fresh radish juice for three weeks.

According to the results (Table Ib) of the experiment performed on another group of nine normal guinea pigs, the amount of adrenaline-like substance in serum shows 9.26 mg.% in minimum, 19.34 mg.% in maximum, and 14.646 mg.% on an average.

2. *Scorbutic animals.*

In scorbutic guinea pigs, there can be seen a decided decrease of adrenaline content in suprarenals in all scorbutic days (Tables II, III and V).

TABLE V. (Average).

Animal group	Suprarenal weight	Suprarenals Adrenaline			Adrenaline-like Substance in serum	
	gm.	mg.	mg. %	per kilo body wt.	mg. per 0.5 cc.	mg. %
Normal	0.2551	0.0585	23.583	0.1748	0.0732	14.646
Scorbutic days	8-9	0.2614	0.0269	11.693	0.0715	10.400
	11	0.3117	0.0270	9.048	0.0739	8.568
	12	0.2445	0.0232	9.435	0.0665	9.473
	13-15	0.2812	0.0284	10.552	0.0856	9.000
	17-19	0.3752	0.0225	6.888	0.0688	11.344
	20-22	0.3680	0.0225	0.655	0.0871	10.275
Fasted	0.2557	0.0358	14.435	0.1005	0.0409	8.170

Adrenaline-like substance in serum of scorbutic guinea pigs is also decreased remarkably.

### 3. *Fasted Guinea Pigs.*

Morikawa (1920) reported that there can be seen an increase of weight of suprarenals in the fasted guinea pigs, and the increase is induced by hypertrophy of Cortex of suprarenals accompanied by the increase of neutral fat and other lipins. Mauriquand et Leulier (1928) further reported that by giving merely water the adrenaline content in suprarenals of guinea pigs decreased in the inanition period. As it was seen that the scorbutic guinea pigs often did not take any food near the end of their lives, we examined the influence of inanition upon the adrenaline content in suprarenals, and the amount of adrenaline-like substance in the serum of guinea pigs. The results are shown in Table IV.

In fasted guinea pigs there appears a tolerable decrease of adrenaline content in suprarenals as compared with the normal, but it is still higher than that of scorbutic animals. The adrenaline-like substance in serum of fasted animals does not differ from that of the scorbutic ones (Tables IV). In the course of from 8 to 17 scorbutic days, as there appears no change in the appetite of the animal as compared with the control, the decrease of the contents of both adrenaline and adrenaline-like substances in experimental scurvy, seems to take place quite independently of inanition.

## III. CONCLUSIONS.

1. Adrenaline content in suprarenals and adrenaline-like substance in serum of scorbutic guinea pigs show a decided decrease in comparison with that of the normal.

2. During the inanition period, adrenaline content in suprarenals also decreases, but it is still greater than in the case of experimental scurvy.

3. Adrenaline-like substance in the serum of fasted animals decreases to almost the same extent as the scorbutic.

4. The decrease of both adrenaline content in suprarenals and adrenaline-like substance in serum of guinea pigs fed on a vitamin C free diet is not due to starvation itself.

## REFERENCES.

- Chikano, M. (1925): Osaka-Igakkai-Zasshi, **24**, 757.  
Chikano, M. (1926): Osaka-Igakkai-Zasshi, **25**, 101.  
Chikano, M. (1926): Osaka-Igakkai-Zasshi, **25**, 201-205.  
Chikano, M. (1926): Osaka-Igakkai-Zasshi, **25**, 1679.  
Imamura, M. (1925): Keio-Igaku, **5**, 59.  
Igarashi, E. and Tagaya, T. (1929): J. of Biochem., **2**.  
Morikawa, N. (1920): Osaka-Igakkai-Zasshi, **19**, 244.  
Mauriquand et Leulier (1925): C. r. Acad. Sci., **180**, 1699.  
Mauriquand et Leulier (1927): C. r. Soc. Biol., **22**, 280.  
McCarrison (1919): British Medical Journal, No. 3059, Aug.  
Nakamura, M. (1920): Sata-Zaishoku-25nen-Shukuga-Ronbun-Shu, 160.  
Nagayama, T. and Tagaya, T. (1929): J. of Biochem., **2**.  
Suto, K. and Inoue, K. (1928): Suto's Sho-Ikagaku-Jisshu, 237.

*Additional Writing:* We are indebted to Count Mutsu and Baron Takagi for the expenses of this work, which have been defrayed from Ujun-Kwai.



# BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER CHEMISCHEN KONSTITUTION UND DER BIOLOGISCHEN WIRKUNG: ÜBER AMOYSTATISCHE GIFTE.\*

## I. Mitteilung

VON

TAKAOKI SASAKI UND ICHIRO OTSUKA.

(Aus dem Sasaki-Laboratorium im Kyoundo-Hospital zu Tokio.)

(Eingegangen am 13. Oktober 1930)

Unter amyostatischen Giften möchten wir diejenigen, zusammenfassen, welche bei Versuchstieren Störungen der Myostatik resp. Statokinetik, die gleichzeitig mit Rigidität der Skelettmuskulatur einhergehen, hervorzurufen imstande sind. Klinisch hat Strümpell (1916) solche Syndrome als amyostatischen Symptomenkomplex bezeichnet. In seiner mustergültigen Abhandlung hat er dies ganz allgemeinverständlich näher auseinandergesetzt. Unter Myostatik verstehen wir mit H. Spatz (1927) "das unwillkürliche Zusammenspiel der Körpermuskulatur zwecks Gewährleistung der Körperhaltung einschliesslich der Innervationsbereitschaft für willkürlich innervierte Bewegungen". Dieser nichts praecjudizierende Ausdruck ist unseres Erachtens weit zweckmässiger als eine andere etwa lokalisatorische Nomenklatur, indem die Lehre vom extrapyramidal-motorischen System trotz unermüdlichen Arbeitens namhafter Autoren immer noch in der Kinderschuhe steckt.

Das vor etwa zwanzig Jahren noch schwer zugängliche Arbeitsgebiet wurde in letzterer Zeit von verschiedenen Seiten erforscht. Um einige klassische Arbeiten zu nennen; klinisch und pathologisch

---

\* Ein Teil der Tierversuche demonstriert in der Koshin-kai am 15. Dez. 1928 und in der Sitzung der med. Gesellschaft zu Tokio am 27. Okt. 1929. Vortrag gehalten von Sasaki in der Generalversammlung der Jap. bioch. Gesellschaft am 13. Okt. 1930.

von C. und O. Vogt, S. A. K. Wilson usw., experimentell physiologisch vor allem von Ch. Sherrington, auch besonders über Körperstellung und diesbezügliche Reflexe von R. Magnus und Mitarbeiter. Wenn auch Sherringtons erste, klassische Publikation schon dreissig Jahre zurückgelekt hat, so bleibt doch immer noch die Übereinkunft zwischen den pathologischen Beobachtungen und den experimentell-physiologischen Ergebnissen viel zu wünschen übrig. Das war wohl der Grund, dass diesbezügliche höchst wichtige Errungenschaften sich nicht gebührend in der klinischen Medizin einbürgerten. Die Verheerungen der Encephalitis epidemica mit ihrer Nachkrankheit (besonders Parkinsonismus und mannigfaltige, motorische Dyseoordination), haben aber von neuem unser lebhaftes Interesse für das Forschungsgebiet wachgerufen. Über die chemisch definierbaren Gifte, die sowohl klinisch als auch experimentell derartige Syndrome zu verursachen vermögen, ist nur wenig bekannt. CO, CS<sub>2</sub> und Mangensalze etc.\* sind als besonders interessante Unfall- resp. Gewerbe gifte erkannt, welche auch experimentell sog. Pallidumsyndrome hervorzurufen imstande sind. Allerdings sind sie chronische Zerstörungsgifte; ob die Eigenartigkeit der Lokalisation im Sinne der Pathoklise von Vogt oder im Sinne des Vasaltypus von Spielmeyer auszulegen sei, bleibe hier dahingestellt. Als ein pharmakodynamisches Gift, dessen Wirkung bei einer geeigneten Dosis nach einigen Stunden spurlos vorübergeht, kam bisher nur Bulbo-capnin in Betracht. Das schon im Jahre 1894 von M. Freund und W. Josephi aus *Corydalis cava* isolierte Alkaloid,\*\* dessen Konstitution später auch von J. Gadamers und seinen Mitarbeitern ermittelt und neuerdings von E. Späth, H. Holter und R. Posega (1928) bestätigend festgestellt wurde, erzeugt bei Ver-

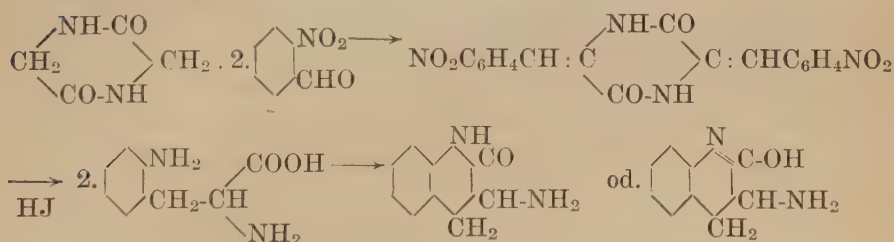
---

\* Siehe F. Lotmar (1926). Ueber diesbezügliche jap. Literatur vergl. N. Araki (1929).

\*\* Aus dem bei uns in Japan einheimischen Tuber *corydalis* (*C. remota*, var. *genuina*, Maxim. und *C. decumbens*, Pers.) haben Y. Asahina und M. Yose (1919) das Alkaloid ebenfalls isoliert.

suchstieren bei vorsichtiger Einverleibung einer geeigneten Dosis hypokinetisch-hypertonische Syndrome, die der Katalepsie sehr ähneln. Ueber die Wirkungslokalisation steht eine endgültige Entscheidung noch aus (H. de Jong et H. Baruk, 1929; H. de Jong, 1929; G. Schaltenbrand, 1929). E. Frank, R. Stern und M. Nothmann (1921) beschrieben auch einen eigenartigen Effekt des Guanidins auf die Katze, welcher auch als ein amyostatischer aufgefasst werden soll. Diese höchst merkwürdige Erscheinung ist aber wahrscheinlich keine direkt pharmakodynamische Zentralnervenzirkung. Neuerdings bezeichnete K. Beringer (1928) Banisterin\* als ein neues, auf das extrapyramidal-motorische System wirkendes Gift.

Aus der Überlegung heraus, dass Aminophenol- und Aminobenzolderivate, so z. B. Phenacetin, Anästhesin, Novocain etc. eine mehr oder minder starke Nervenwirkung haben, hat Sasaki seinen Mitarbeiter H. Ueda (1928) beauftragt, Aminophenylalanine mittelst der Glycinanhydridmethode darzustellen. Bei der Synthese der o-Verbindung tritt die Ringschliessung unter Bildung von 3-Aminohydrocarbostyryl ein. Offenbar handelt es sich dabei um einen analogen Chemismus der reduktiven Bildung von Hydrocarbostyryl aus o-Nitrohydrozimmtsäureester.\*\*



Diese neue Substanz hat sehr interessante biologische Eigenschaften. Durch subkutane Einverleibung des salzsauren Salzes (0,15–0,2 g pro Kg) kann man Versuchstiere zuerst in Dyscoordina-

\* Ueber die Banisterin-Harmin-Frage siehe I. Herzog (1930).

\*\* Vergl. Meyer-Jakobson II, 3, 981, (1923).

tion der Myostatik resp. Statokinetik, sodann in einen akinetisch-hypertonischen Zustand versetzen, welcher recht ähnlich bei decerebrierten Tieren beobachtet wird und auch lebhaft an die sog. akinetisch-rigiden Syndrome der menschlichen Pathologie erinnert. Das Tier (Kaninchen) gerät nämlich bei der subkutanen Einspritzung nach 10-15 Minuten zuerst in ein Wackeln des Kopfes eventuell des ganzen Körpers, sodann verliert seine Körperstellung auf den Hinterkörper und zwar mit seitwärts-überstreckten, rigiden Hinterbeinen, fällt bald auf die Seite und gerät meistens im Lauf resp. Schwimm-Krämpfe, oder Torsionskrämpfe,\* wird alsbald unter starker Dorsalflexion des Halses mit rigiden Beinen ganz ruhig, und scheint allmählich in einen Schlummerzustand überzugehen, aus dem es durch irgend einen Reiz leicht geweckt werden kann. In Ruhe gelassen, verfällt es wieder in Schlummer, der gewöhnlich 1-2 Stunden dauert. Nach dem Erwachen sucht das Tier aufrecht zu stehen. Dabei kann man das dissoziierte Wiederauftauchen verschiedener Steh- und Stellreflexe, die von Magnus und Mitarbeiter beschrieben wurden, beobachten. Die Erscheinung geht nach und nach ganz vorüber, und nach einigen Stunden wird das Tier wieder ganz gesund. Bei einem Kaninchen konnten wir selbst 6 Wochen lang täglich zweimal solche Vergiftungsanfälle hervorrufen, ohne irgendeine augenfällige bleibende Schädigung äusserlich beobachten zu können.\*\*

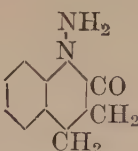
Bei der successiven Einverleibung einer kleinen Menge mit einem gewissen kurzen Zeitintervall, sodass das Gift nach und nach im Körper angehäuft wird, kann man die Entfaltung der motorischen Syndrome nacheinander beobachten.

Aus Bequemlichkeit beim biologischen Arbeiten haben wir das salzsaure Salz des 3-Aminohydrocarbostyrils kurzweg 3-Astyl

---

\* Die Krämpfe hören meist auf, wenn man das Tier an Ohren und Hüfte in der Luft hält und ihm möglichst normale aufrechte Stellung gibt, um in der Seitenlage auf dem Boden sofort wieder zu beginnen.

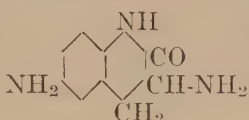
\*\* Ganz junge Tiere scheinen weniger widerstandsfähig besonders gegen wiederholte Injektionen zu sein.

genannt. 1-Aminohydrocarbostyryl  wurde schon

von E. Fischer und H. Kuzel (1883), 7-Aminohydrocarbostyryl

 von S. Gabriel und J. Zimmerman (1879)

synthetisiert. Der 1-Körper ist weit giftiger wie 3-Astyl, während der 7-Körper recht unschädlich ist.\* Die beiden Substanzen scheinen aber für unseren Zweck ganz belanglos zu sein. 3-6-

Diaminohydrocarbostyryl  ist sehr indifferent.

Sein salzsaures Salz vermag bei der Maus in einer Dosis von 0.02 g pro 10 g keine augenscheinliche Erscheinung hervorzurufen. Dass die Addition noch einer Aminogruppe im Benzolkern die amyostatische Wirkung des 3-Astyls ganz verdeckt, ist höchst merkwürdig. Die Löslichkeitsänderung oder Unfähigkeit zur Enolisierung infolge der Aminierung kommt bei der Interpretation eventuell in Betracht. Die Synthese des 4-Körpers, 4-Aminohydrocarbostyryls\*\*



\* Dass 1- und 7-Körper ziemlich stark antipyretisch wirken, hat K. Watanabe (1930) in hiesigem Laboratorium bei Wärmestichtieren konstatiert.

\*\* Synthetische Versuche des 3-6-Körpers und 4-Körpers werden später publiziert.

gelang uns leider noch nicht, trotzdem wir seinen N-Acyllkörper auf indirekte Weise aus Acylaminozimmtsäure erhalten konnten. Bei vielfachen Versuchen bekamen wir jedesmal das stabile Carbo-styryl, so auch bei der Abspaltung der Benzoylgruppe. Die frühere Erfahrung der Additionsversuche von Hydroxylamin an o-Amino-zimmtsäureester (Th. Posner, 1912) legte auch die Vermutung nahe, dass der 4-Körper überhaupt sehr labil und schwerlich frei existenzfähig sein dürfte.

Bei erneuerten Untersuchungen der Resorptionswirkung des Novocains besonders durch successive subkutane Einverleibung haben wir beobachtet, dass dieser Aminobenzoylkörper (p-Aminobenzoyl-diäthyl-amino-äthonal-chlorhydrat  $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOCH}_2\text{CH}_2\cdot\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2, \text{HCl}$ ) bei Kaninchen auch ein ganz ähnlichen Phänomen wie 3-Astyl zu entfalten vermag.\* Tutocain,  $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOCH}(\text{CH}_3)\cdot\text{CH}(\text{CH}_3)\cdot\text{CH}_2\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_2, \text{HCl}$ , ein Chlorhydrat des dl-p-Aminobenzoyl-dimethylaminomethylbutanols, verhält sich ebenso. Die amyostatischen Erscheinungen infolgen der subkutanen, geteil-

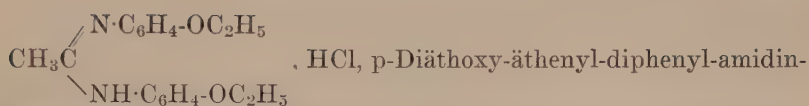
ten Einspritzung des Acoins, 
$$\begin{array}{c} \text{NH}\cdot\text{C}_6\text{H}_4\cdot\text{OCH}_3 \\ \diagup \\ \text{C}=\text{N}\cdot\text{C}_6\text{H}_4\cdot\text{O}\cdot\text{C}_2\text{H}_5, \text{HCl}, \\ \diagdown \\ \text{NH}\cdot\text{C}_6\text{H}_4\cdot\text{OCH}_3 \end{array}$$

Dianisyl-monophenethyl-guanidin-chlorhydrats sind ganz sonderbar; das Tier verliert seine Körperhaltung, die Fähigkeit, seine eigene Hockstellung einzunehmen, indem es den Bauch direkt auf dem Bode legt, die rigiden vorderen und hinteren Beine nach den Seiten gestreckt. Von Zeit zu Zeit macht das Tier in dieser Stellung einen hastigen, rutschenden Gang, indem es dabei nur wenig vorwärts kommt. Das Seitwärts-fallen tritt erst bei der Applikation einer tödlichen Dosis meist kurz vor dem Tode auf.

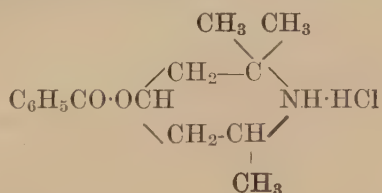
Auffallenderweise verhält sich Holocain,

---

\* Beobachtungen der Intoxikationserscheinungen nach Lokalanästhesie beim Menschen und die Tierexperimente liegen schon mehrfach vor, allerdings wegen des alten Datums ohne eingehende Rücksicht auf die Myostatik. Ueber Lokalanästhetica vergl. H. Braun (1925), E. Poulsson (1919), Ferner E. Fourneau (1921). Jap. Lit.—K. Yamakami und T. Kubo (1924).



chlorhydrat, bei Kaninchen trotz der Aehnlichkeit der chemischen Konstitution mit Acotin ganz anders. Im Gegensatz zur Acotinvergiftung verliert das Tier dabei leicht die sog. Stellreflexe und fällt auch bei einer bald vorübergehenden Vergiftung auf die Seite. Cocain, Tropacocain ebenso auch synthetische Benzoyl-alkamine, Stovain und Alypin haben ganz ähnliche Wirkung. Durch successive Einverleibung der geteilten Dosis mit einem kurzen Intervall kann man bei allen obengenannten Giften ganz ähnliche hypertensive, amyostatische Wirkungen vor dem Auftreten der epileptiformen Krämpfe konstatieren. Nur beim Versuch mit Cocain ist es nicht leicht, die hypertensive, amyostatische Phase rein dissoziiert zu Tage zu fördern, da bekanntlich Cocain bei der gleichen Dosis unregelmässig und ungleichmässig wirkt. Dass Cocain besonders gern auf die Grosshirnrinde einwirkt, hat S. Morita (1915) schon früher experimentell nachgewiesen. Das Lokalanästheticum des Piperidinabkömmlings, Eucain-B,  $\alpha, \alpha'$ -Trimethyl- $\gamma$ -[benzoyl-oxy]-piperidin-chlorhydrat



hat insofern Aehnlichkeit mit Acotin, dass der Haltungsverlust und das Seitwärtsfallen bei Kaninchen ziemlich gut dissoziiert konstatierbar sind. Das Seitwärtsfallen bei der schwereren Vergiftung ist aber dabei kein unabwendbar übeles Vorzeichen wie bei der Acotinvergiftung.

Novocain wurde als ein Lokalanästheticum bekanntlich von einigen Autoren (A. Fröhlich und H. Meyer, Liljestrand und Magnus, Schüller, cit nach Spiegel, 1927) dem Rigor ent

gegenwärtig verwendet, sei es durch das Wegschaffen des sog. proprioceptiven Reizes, sei es infolge der Austauschbindung (Vergl. K. Zipf, 1929). Es ist nun sehr merkwürdig, dass dasselbe Mittel bei einer geeigneten Applikationsweise und einer genügenden Dosis ganz entgegengesetztes Verhalten zeigt.

Der amyostatische Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetica so z. B. Novocain, Tutocain, Acoïn etc. scheint ganz ähnlich wie der des 3-Astyls zu sein. Jede der von uns untersuchten Substanzen, in einer Dosis unter der Wirkungsschwelle subkutan eingespritzt, lässt die Wirkung des 3-Astyls nach 5–10 Minuten ganz deutlich zum Vorschein kommen, wenn es auch in einer unterschwelligen Dosis vorher eingespritzt ist. Umgekehrt vermag auch 3-Astyl jene Substanzen in einer unterschwelligen Dosis in bezug auf ihre amyostatische Wirkung vollwertig zu machen. Dies lässt sich am besten beim Kombinationsversuch des 3-Astyls mit Acoïnvorbehandlung deutlich veranschaulichen. Mit Bulbocapnin ist diese additive Erscheinung aber kaum zu spüren, und das Vergiftungsbild des letzten Giftes ist auch in verschiedenen Punkten anders wie das des 3-Astyls.\* So wird z. B. beim Vergiftungstod durch eine genügend grosse Dosis des 3-Astyls die Muskulatur der Versuchstiere (Kaninchen) sofort ganz atonisch, wie ein Fell, während die Starre beim Vergiftungstod durch Bulbocapnin hochgradig ist und auch längere Zeit andauert.

Wenn man verschiedene Gifte unter dem Gesichtspunkt der Myostatik resp. Statokinetik literarisch studiert und auch experimentell untersucht, d. h. nach ihrer amyostatischen Wirkung fahndet, so wird sich eine neue Perspektive eröffnen. In der Tat haben R. Magnus (1924) und seine Mitarbeiter die Wirkung von Narkotika der Fettreihe und von einigen Krampfgiften (Kampher, Strychnin, Pikrotoxin etc.) auf die Stellreflexe nach ihrem Schema untersucht und viele interessante Tatsachen gefunden. Da aber zahlreiche Pharmaka neben den animalischen auch die vegetativen

---

\* Vergl. unten Kombinationsversuche, auch N. Hayashi (1930).

Funktionen stark beeinflussen, und zwar die Erscheinungen seitens der letzteren meist in den Vordergrund treten, ist die scharfe Abgrenzung des pharmakologischen Wirkungsbereiches in bezug auf Myostatik resp. Statokinetik manchmal fast unmöglich. Alle Schlafmittel, sog. Grosshirn- und Hirnstammhypnotica, verursachen bei Striatum- oder Thalamustieren das Verschwinden der Körperstell- und Labyrinthreflexe (Cit. nach E. P. Pick, 1928). So bringt z. B. Veronalnatrium subkutan eingespritzt, auch bei intakten Kaninchen einen eigenartigen unbeholfenen, taumelnden Gang, ausserdem Hypokinese und Hypotonie der Skelettmuskulatur hervor. Auch durch die successive Einverleibung konnten wir dabei keine hypertonische Phase ausfindig machen. In Anbetracht der hypertonischen Resorptionswirkung jener Lokalanästhetica ist die ausschliessliche Hypotonie durch die Hirnstammhypnotica höchst merkwürdig. Die näheren, vergleichenden Untersuchungen sowohl von der biologischen, als auch von der histopathologischen Seite gehören wohl zu einem sehr interessanten Problem. Wohl könnte man solche hypotonischen Gifte auch zu amyostatischen Giften im weiteren Sinne rechnen. Um aber eine zu weitläufige Abschweifung zu vermeiden, schlagen wir vor, unter einem amyostatischen Gift im engeren Sinne nur dasjenige zu verstehen, dessen myastatische Wirkung immer gleichzeitig mit der Rigidität der Skelettmuskulatur einhergeht. Diese Gruppierung der Giftstoffe vom dem Standpunkte der Myostatik würde für die weitere Entwicklung dieses Arbeitsgebietes von gewissem Nutzen sein, sich andererseits aber dabei mancher Schwierigkeiten und Willkür kaum erwehren können. Kein Gift wirkt ganz einheitlich. Ein und dasselbe Gift ändert fernerhin bekanntlich manchmal sein Wirkungsbild nicht nur je nach der Applikationsweise, sondern auch nach den phylo- und ontogenetischen Entwicklungsstufen.

Nach unseren Versuchsergebnissen glauben wir in 3-Astyl, in den Aminobenzoyl-alkaminen etc. typische amyostatische Gifte erblickt zu haben, indem durch sie zumeist die Dissoziation des motorischen Geschehens augenfällig zu Tage gefördert wird. Alle

N-haltigen Lokalanästhetika überhaupt, die wir bisher untersucht haben, Novocain, Tutocain, Holocain und Acoïn, Stovain, Alypin, Eucain-B, Cocain und Tropacocain, haben als ihre Resorptionswirkung bei einer geeigneten Applikationsweise eine wenn auch je nach der Konstitution etwas differente, doch typische amyostatische Wirkung gegen Säugetiere, während bei dem N-freien Lokalanästheticum, Benzylalkohol (D. I. Macht, 1918) bei der subkutanen Applikation eine solche Wirkung nicht zu konstatieren war. Diese Tatsache verleiht der chemischen Konstitution bei der Frage der biologischen Wirkung eine gewisse Wichtigkeit. Bei 3-Glycylamino-hydrocarbostyryl sind wegen der mildereren, doch länger dauernden Wirkung einzelne myostatische Erscheinungen besonders gut zu beobachten. Die Wirkung auf Myostatik resp. Statokinetik ist reiner als die von 3-Astyl. Glykokoll ist bekanntlich ein entgiftendes Agens im Organismus. Nach neueren Erfahrungen von Guggenheim (1913) und von v. Braun (1927) an Peptaminen resp. Decarboxypeptiden erleiden auch pharmakodynamisch stark wirksame Amine durch N-Kuppelung mit der Glycylgruppe eine ganz bedeutende Herabsetzung ihrer Wirksamkeit. Chemisch konstitutionell steht 3-Glycylamino-hydrocarbostyryl in einer nahen Verwandtschaft zu den Peptaminen. Recht bemerkenswert ist somit, dass die Angliederung der Glycylgruppe an den Stickstoff in diesem Fall keine so bedeutende Einbusse an Wirksamkeit mit sich bringt. Das Verkappen des Aminostickstoffes mit der Diäthylaminoacetyl- resp. Dimethylaminoacetylgruppe hat sogar die Verstärkung der Giftigkeit zur Folge, während beim Monoäthyl- resp. Monomethyl-Körper kein augenfälliger Einfluss zu bemerken ist.

Dass die 3-Astyl-Wirkung als extrapyramidal-motorisch resp. amyostatisch (Strümpell) zu betrachten ist, wurde durch weitere Versuche bestätigt, indem das Gift die Hypertonie der Enthirnungstiere steigert, dagegen bei Rückenmarkstieren und bei Tieren, denen ihre Hinterwurzeln durchgeschnitten sind, keine Rigidität hervorruft (N. Hayashi, 1930). Die weitere physiologische Analyse mit operierten Tieren hat Kollege Prof. Kanshi Sassa liebens-

würdiger Weise übernommen. Unter seiner Leitung hat Dr. Nobuo Hayashi in seinem Laboratorium die Versuche mit 3-Astyl an Katzen ausgeführt.

Nach der histopathologischen Serienuntersuchung der mit 3-Astyl längere Zeit vergifteten Kaninchen (23 Injektionsfälle und 8 Kontrollen) erwies sich 3-Astyl auch aus den morphologischen Befunden als ein Hirnstammgift. Konstant und ganz auffallend waren in allen untersuchten Fällen ohne irgend ein entzündliches Zeichen auffällige Schädigung der Ganglienzellen, Gliaveränderungen und weitere histopathologische regressive Erscheinungen elektiv in Pallidum und Substantia nigra, während bei allen Kontrolltieren, sogar bei einem an Spontan-Encephalitis leidenden Tier niemals so deutliche Veränderungen konstatierbar waren. Besonders beachtenswert ist ferner, dass die roten Kerne und auch die Hirnrinde fast unbeschädigt blieben. Bemerkenswerterweise waren dabei auch das Rückenmark und die peripheren Nerven als ganz intakt zu bezeichnen. Bei einigen mit grösserer Dosis acut beendeten Vergiftungsfällen waren die degenerativen Veränderungen ausgedehnter als bei den protrahiert mit kleinerer Dosis vergifteten; d. h. die Zerfallvorgänge waren nicht nur in Pallidum und Substantia nigra, sondern auch in der Kleinhirnrinde, in den Cochlearis- und Olivenkernen ausgeprägt. Immerhin sind sie in der Substantia nigra am markantesten. Die histopathologische Untersuchung der wiederholt mit salzsaurem p-Aminobenzoyldiäthyl-amino-äthanol und auch mit Acoïn vergifteten Tiere wurde auch von Iwao Wake in hiesigen Laboratorium ausgeführt. Er gelangte zu einem ähnlichen Resultate. Das Ergebnis wird von ihm in einer anderen Fachzeitschrift publiziert.

In der Hoffnung, dass unser Ergebnis einige Beiträge zur pathologischen Physiologie der Körperhaltung resp. Statokinetik und somit eventuell auch des Hirnstammes liefern möge, erlauben wir uns die biologischen Beobachtungen und einige synthetische Versuche von 3-Astyl und seinen Derivaten mitzuteilen. Ausserdem hat 3-Astyl eine lokalanästhetische Wirkung, ist aber wegen seiner

lokalen Reizwirkung von keinem praktischen Wert. Dass das Aminohydrocarbostyryl doch eine Grundsubstanz für ein ungiftiges, brauchbares Lokalanästheticum sein könnte, ist u. E. nicht von der Hand zu weisen. Bei der Untersuchung erfreuten wir uns der Hilfe der Herren H. Ueda und T. Hashimoto, wofür wir ihnen unseren besten Dank sagen.

### **Beschreibung der biologischen Versuche.\***

#### **I. ALLGEMEINE BEOBSACHTUNG DER AMYOSTATISCHEN WIRKUNG VON 3-ASTYL UND SEINEN DERIVATEN.**

Wie bekannt unterliegt der pharmakodynamische Effekt der Gifte resp. Pharmaka selbst für eine bestimmte Tierart je nach der Individualität, den Jahreszeiten, dem Alter und Fütterungszustande etc. einer mehr oder weniger starken Schwankung. Um eine klare Vorstellung und einen sicheren Einblick zu bekommen, arbeiteten wir vorerst hauptsächlich mit Kaninchen (bei neuen Substanzen Vorversuche mit Maus), da Haltungs- und Stellreflex meist ebenfalls an Kaninchen untersucht worden sind. (Magnus und Rademacker). Aus zahlreichen Versuchen mit 3-Astyl an Kaninchen (1,5–2,5 kg) ergab sich das folgende Bild.

5–10 Minuten nach der subkutanen Injektion: Oft Harn- und Kotentleerung, bedeutende Vermehrung der Atemzahl, Herzschlag verhältnismässig wenig beeinflusst. Zuerst unruhig, bald träg unbeweglich in der dunklen Ecke.

10–20 Minuten n. Inj.: Zuerst Steifigkeit der Hinterbeine, horizontales Wackeln des Kopfes, eigenartiger steifer Gang mit Wackeln des ganzen Körpers. Dann Seitwärtstrecken der hyper-tonischen Hinterbeine bei der Seitenlage des Hinterkörpers (Verschwinden der Stellreflexe auf den Hinterkörper). Bald ganze Seitenlage (Verschwinden der Stellreflexe auf den Kopf), meist

---

\* Wenn es auch bei intakten Tieren kaum möglich ist, ganz die Magnusche Analyse zu acceptieren, so wurde sie doch bei unserer Beobachtung reichlich berücksichtigt. (R. Magnus, 1924) Vergl. auch Rademaker (1926).

sofort Schwimm-resp. Laufkrämpfe, manchmal Torsionskrämpfe.\* Maximale Dorsalflexion des Halses. Vorderbeine nach vorn gestreckt, ganz rigid. Hinterbeine meist etwas gebeugt und weniger rigid (bei manchen Kaninchen auch Hinterbeine gestreckt und ganz hypertonisch). Erweiterung der Lidspalte und Pupille, Hervortreten des Augapfels, Tränensekretion, Vermehrung der Speichelsekretion.\*\* Meistens spontaner Nystagmus. Lichtreaktion der Pupille träg, Lidschlagreflex auch nicht lebhaft, nur beim direkten Berühren der Cornea positiv. Augendrehreaktion, Kopfdrehreaktion auf die Augen, Kopfdrehnystagmus negativ. Sprungbereitschaft negativ. Geräuschreaktion der Ohrmuschel auch negativ.

30–40 Minuten n. Inj.: Exophthalmus verschwindet. Das Tier geht in derselben Stellung allmählich in Schlummerzustand über. In diesem Stadium bleibt Kneifreflex am Schwanze schwach erhalten.

Dieser Zustand dauert etwa  $1\frac{1}{2}$ –2 Stunden. Allmähliche Wiederherstellung der Augenreaktion, vor allem Licht-, Cornealreflex und Augendrehnystagmus, dann schwaches Wiederauftauchen der Geräuschreaktion. Das Tier versucht zuerst vergeblich den Kopf zu erheben. Mit der Zeit nimmt der Kopf resp. Oberkörper allein die aufrechte Stellung ein. In diesem Stadium kann man oft sehr deutlich den sog. tonischen Halsreflex beobachten. Legt man nämlich das Tier in die Seitenlage, um sog. Labyrinthinfluss zu vermeiden, und beugt den Kopf ventralwärts, so verschwindet die Rigidität der Vorderbeine, indem die Hypertonie der

---

\* “Krämpfe” ist eine vulgäre Benennung ohne exakte wissenschaftliche Definition. Wir haben sie herkömmlicherweise gebraucht, nur um die Erscheinung zum Ausdruck zu bringen. Da dieselbe Erscheinung auch bei decerebrierten Tieren nach der Injektion von 3-Astyl auftritt, sind solche Krämpfe wohl nicht von corticaler Natur. Die Beziehung zwischen denselben und den Haltungs- resp. Stellreflexen muss näher erforscht werden.

\*\* Exophthalmus, Mydriasis und Sekretionsvermehrung fehlen in der Regel bei leichter Vergiftung.

Hinterbeine augenfällig zunimmt. Bald kehrt das Becken auch in die aufrechte Stellung zurück. Das Tier ist noch nicht imstande, die normale Hockstellung einzunehmen, sondern liegt ganz hypokinetisch mit auf den Boden sich stützenden Unterkiefer und Bauch. Wenn man dabei das Tier forciert auf die Beine bringt und durch irgend einen Reiz zum Vorwärtsgen zwingt, bleiben seine Vorder- und Hinterbeine immer noch im hypertonischen Ueberstreckungszustande, sodass es mit gekrümmtem Rücken, die Hüfte hoch und den Oberkörper niedriger, eine sog. Katzenrückenstellung einnimmt. Der Körper schwankt, wackelt, scheint nicht imstande zu sein, an einer bezweckten Stelle Halt zu machen, sondern stürzt daran vorbei. Bemerkenswerterweise kommt die sog. Sprungbereitschaft am spätesten zum Vorschein. Nach einigen Stunden erholt sich das Tier vollständig zum normalen Zustand wie vor der Injektion. Die Sehnenreflexe bleiben bis kurz vor dem Tode erhalten, was sich bei mit grösserer Dosis stark vergifteten, wenig rigiden Tieren deutlich nachweisen lässt.

Die tödliche Dosis von 3-Astyl ist für Kaninchen 0,3–0,35 g pro kg. Wenn man eine grosse Dosis so z. B. 0,2–0,25 g pro kg einem Kaninchen subkutan injiziert, so verschwindet die Hypertonie kurz nach dem Auftreten; die Hypotonie tritt alsbald an deren Stelle. Von Zeit zu Zeit kommen epileptiforme Krämpfe mit Trismus zum Vorschein.

3-Astyl, 0,1 g pro kg intravenös injiziert, tötet das Tier momentan, und zwar mit totaler Atonie der Skelettmuskulatur, so dass beim Handhaben der Leichnams sich wie ein Fell anfühlt. Der Angriffspunkt bei der intravenösen Injektion muss noch erforscht werden.

*3-Glycylamino-hydrocarbostyryl-chlorhydrat* (*Glycyl-astyl*).—1,0 g auf 20,0 ccm 0,9%iger Kochsalzlösung. 0,2–0,25 g pro kg Kaninchen auf einmal oder zuerst 0,15 g pro kg, nach je 15 Minuten noch 2–3 mal je 0,05 g pro kg subkutan. Im grossen und ganzen ist die Wirkung fast dieselbe wie bei 3-Astyl. Das amyostatische Phänomen entwickelt sich bedeutend langsamer und lange anhal-

tend, sodass Glycyl-astyl geeigneter als 3-Astyl ist, um die amyostatischen Erscheinungen zu demonstrieren. Der sog. Labyrinthreflex auf den Kopf, Kopfdrehreaktion und Kopfdrehnystagmus bleiben ziemlich lange erhalten, um schliesslich in die akinetische Seitenlage überzugehen.

*3-Sarkosylamino-hydrocarbostyryl-chlorhydrat.*—Dieselbe Konzentration; zuerst 0,15–0,2 g pro kg, nach je 15 Minuten noch 2–3 mal je 0,05 g pro kg. Die Wirkung auch fast dieselbe.

*3-Aethylaminoacetyl-amino-hydrocarbostyryl-chlorhydrat.*—Dieselbe Konzentration; zuerst 0,3 g pro kg Kaninchen, nach je 15 Minuten noch 2–3 mal je 0,1 g pro kg subkutan. Die amyostatische Wirkung im allgemeinen ähnlich wie die des 3-Astyls. Entsprechend der einverleibten Menge bedarf das Tier einer weit längeren Zeit zur Erholung.

*3-Dimethylaminoacetyl-amino-hydrocarbostyryl-chlorhydrat.* — 1,0 g in 0,9%iger Kochsalzlösung auf 20,0 ccm aufgefüllt. 0,1 g pro kg auf einmal, besser zuerst 0,05 g pro kg, nach 15 Minuten noch einmal gleiche Dosis subkutan. Die Wirkung fast dieselbe wie die der anderen Astyl-Derivate.

*3-Diäthylaminoacetyl-amino-hydrocarbostyryl-chlorhydrat.*—Die Lösung wurde wie die des Dimethyl-Körpers bereitet. 0,05 g pro kg subkutan. Die Wirkung ist auch fast dieselbe wie die der Dimethyl-Körper. Bei 0,15 g pro kg wirkt das Gift für Kaninchen tödlich.

## II. VERSUCHE ÜBER DIE AMYOSTATISCHE WIRKUNG VON LOKALANÄSTHETICA.

Nachdem uns wahrscheinlich geworden war, dass die amyostatische Wirkung den meisten Lokalanästhetica innewohnt, mussten wir eine geeignete Konzentration dazu für jedes Lokalanästheticum eruieren. Um eine klare Vorstellung zu bekommen, haben wir sodann bei der Untersuchung immer dieselbe Konzentration der Lösung benutzt. Seit einigen Jahren wurden die zahlreichen Versuche wiederholt in verschiedenen Jahreszeiten ausgeführt und

beobachtet. Da die Resorptionswirkung der meisten Lokalanästhetica als Vergiftungserscheinung in der Literatur nur kurzweg als Parese, Lähmung und auch vereinzelt als Koordinationsstörung der Bewegung beschrieben ist, geben wir im folgenden diejenige Dosis an, welche hauptsächlich die amyostatische Wirkung zu demonstrieren geeignet ist.

Käufliche Präparate wurden durch Stickstoff- und Schmelzpunktbestimmung kontrolliert und eventuell umkrystallisiert, Dimethylamino-dimethyläthyl-benzoyl-carbinol-chlorhydrat (Stovain) nach Fourneau (1921) dargestellt.

Da die Wirkungsschwelle trotz konstanter Konzentration, wie oben gesagt, je nach der Individualität, den Jahreszeiten etc. einer mehr oder weniger augenfälligen Schwankung unterliegt, tut man gut, vorerst die successive Anhäufungsmethode d. i. die subkutane Injektion einer kleinen Menge mit einern kurzen Intervall zu benutzen.

*Novocain*, das gebräulichste, am wenigsten giftige Lokalanästheticum—1,0 g auf 20,0 ccm; 0,1 g pro kg subkutan, dann nach je 15 Minuten 0,05 g pro kg Kaninchen. Bei der Gesamtmenge von 0,2–0,3 g pro kg kann man ein ganz ähnliches Vergiftungsbild wie nach 3-Astyl beobachten. Nur scheint der Schlummerzustand nicht so ausgeprägt wie bei 3-Asthyl zu sein.

*Tutocain*—1,0 g auf 20,0 ccm; die Gesamtmenge 0,05–0,1 g pro kg Kaninchen auf einmal, eventuell geteilt subkutan eingespritzt. Das amyostatische Phänomen ganz ähnlich wie bei Novocain.

*Holocain*—1,0 g auf 20,0 ccm, ca. 0,01 g pro kg auf einmal, oder zuerst 0,005 g und eventuell nach 10 Minuten 0,005 g subkutan. Die Abgrenzung der amyostatischen Vergiftungsphase ist nicht leicht, vielmehr geht die Vergiftung manchmal zu weit. Dabei tritt die Hypotonie nach dem baldigen Verschwinden der Hypertonie auf und anfallsweise kommen epileptiforme Krämpfe zum Vorschein.

*Acoïn*—Mit Acoïn in verschiedener Konzentration hat H. Braun bei Kaninchen Versuche angestellt. Beim Fall 7 (subkut.

Inj. der 2%igen Lsg. in Dosis von 0,164 g pro kg) hat er "Unfähigkeit, die Glieder koordiniert zu bewegen", Tod nach 20 Minuten beobachtet (H. Braun, 1925). Mit Braun teilen wir die Ansicht, dass die Acoing Vergiftung schwieriger übersehbar und kontrollierbar ist, wie die durch andere Lokalanästhetica.

Nach unserer Erfahrung ist am besten wie folgt zu verfahren, um die amyostatische Wirkung zu demonstrieren: 1,0 g auf 20,0 ccm. Jede halbe Stunde zweimal je 0,05 g pro kg, subkutane Inj. Meist nach der zweiten Injektion ein Vergiftungszeichen leichten Grades. Nach einer halben Stunde die dritte Injektion 0,01–0,04 g pro kg je nach dem Zustande des Tieres. Nach einer kurzen Zeit beginnt das Wackeln des Körper besonders beim Gehen. Innerhalb ca. einer halben Stunde sind Bauch und Unterkiefer ganz auf dem Boden, beide rigide Extremitäten nach vorn seitlich gestreckt. Auf Reiz machen die Beine hastige Bewegungen, ohne vorwärtszukommen. Die Erholung meist nach 5–6 Stunden.

*Eukain-B.*—1,0 g auf 20,0 ccm; 0,05 g pro kg dann nach jeder viertel Stunde je 0,025 g pro kg. Meist verliert nach der zweiten Injektion das Kaninchen die Körperhaltung, indem es den Bauch und den Unterkiefer am Boden, die rigiden Vorder- und Hinterbeine seitwärts legt. Kopfdrehreaktion, Augendrehreaktion und Augendrehmystagmus bleiben erhalten. Die Körperstellreflexe werden ziemlich lange verschont. In diesem Stadium sind die Erscheinungen der Acoing Vergiftung ähnlich. Eigenartig sind dabei von Zeit zu Zeit die ruckweisen Zuckungen des Vorderkörpers und Kopfes mit Klappen der Ohren und mit Kaubewegungen, was wir beim Bulbocapnintod des Kaninchens vor dem Seitwärtsfallen und sofort nachfolgenden Sterben beobachtet haben. Meist in 10–20 Minuten nach der dritten Injektion fällt das Tier nach den ruckweisen Zuckungen seitwärts. Epileptiforme Krämpfe, Trismus, anfallsweises Auftreten von Opisthotonus mit Rigidität der Beine. Im schlaffen Zustande geht das Tier in Schlummerzustand über. Nach etwa einer Stunde erholt es sich allmählich und ist nach einigen Stunden anscheinend ganz gesund.

*Stovain*—1,0 g auf 20,0 ccm; 0,05 g pro kg, nach einer viertel Stunde 0,02 g pro kg Kaninchen.

*Allypin*—1,0 g auf 20,0 ccm; 0,01 g pro kg, nach 15 Minuten 0,005 g pro kg eventuell nach demselben Zeitintervall noch 0,005 g pro kg Kaninchen.

*Stovain* und *Allypin* rauben frühzeitig dem Kaninchen die Körperhaltung. Die Vergiftung klingt aber leicht ab, wohl wegen der leichten Resorbierbarkeit der Mittel und der kleinen Menge. Sonst ähnlich wie Novocainvergiftung. Man kann aber leichter die amyostatische Phase überschreiten, d. h. epileptiforme Krämpfe, Trismus und Hypotonie zum Vorschein bringen.

*Cocain* und *Tropacocain*—Die beiden natürlichen Lokalanästhetica haben eine ganz flüchtige amyostatische Wirkung. Man kann aber in einzelnen Fällen, wenn auch umständlich, eine geeignete Applikationsweise für die Demonstration der amyostatischen Phase finden. Meist gelingt es, wenn man wie folgt verfährt: Cocain (HCl)—1,0 g auf 20,0 ccm; je 0,01 g pro kg Kaninchen subkutan, alle 5–10 Minuten bis zum Erscheinen des Vergiftungszeichens. Im Gegensatz zu anderen, synthetischen, Lokalanästhetica geht die Erholung sehr rasch vor sich. Tropacocain(HCl)—1,0 g auf 20,0 ccm; 0,06 g pro kg Kaninchen, nach 10 Minuten 0,03 g pro kg, eventuell noch einmal dieselbe Dosis nach demselben Zeitintervall.

Gerade Cocain halten wir für ein geeignetes Mittel für die Demonstration des Einflusses der Individualität und der äusseren Faktoren auf die Wirkung des Giftes resp. Arzneimittels.

Hervorzuheben ist, dass die Sehnenreflexe bei allen oben erwähnten Experimenten nie erloschen waren, abgesehen kurz vor dem Sterben bei der tödlichen Vergiftung.

### III. KOMBINATIONSVERSUCHE DES 3-ASTYLS (3-AMINOHYDRO-CARBOSTYRIL-CHLOHYDRAT) MIT ANDEREN AMYO-STATISCHEN GIFTEN.

Beim Kombinationsversuche von 3-Astyl mit Acoïn, Eukain-B., Bulbocapnin ist das Resultat deutlich zu beaugenscheinigen.

Da Acoin fast bis kurz vor dem Sterben kein Seitwärtsfallen des Kaninchens bewirkt, tritt die 3-Astylwirkung beim Kombinationsversuche gut gesondert hervor.

0,05 g 3-Astyl pro kg wurden dem Kaninchen subkutan eingespritzt. In dieser Dosis ist meist kein Vergiftungszeichen, nur manchmal Trägheit und Rigidität leichten Grades der Extremitäten, welche so gelassen nach kurzer Zeit ganz vorübergehen, bemerkbar. Nach 20 Minuten wurden 0,05–0,08 g pro kg Acoin nachträglich subkutan eingespritzt. Nach etwa 5–10 Minuten erschienen fast dieselben Vergiftungszeichen, welche oben bei der 3-Astylvergiftung beschrieben sind. Nach 20–30 Minuten nahm das Tier aus der Seitenlage die Bauchlage und Körperstellung ein, wie bei der einfachen Acoinintoxikation. Dieser Zustand dauerte ziemlich lange. Allmählich wurde das Tier wieder vollkommen gesund.

Bei der nachträglichen Injektion von 0,03–0,05 g pro kg Eukain-B. trat ebenfalls die additive Erscheinung zu Tage.

Die Reihenfolge der Injektion wurde auch oftmals umgekehrt d. h. anstatt Astyl-Acoin und Astyl-Eucain, auch Acoin-Astyl und Eucain-Astyl. Die Addition der Wirkung war stets ganz gut konstatierbar.

Mit Bulbocapnin war eine solche Addition der 3-Astylwirkung in bezug auf Myostatik kaum zu beobachten. Da Bulbocapnin in einer nicht tödlichen Dosis nie Seitwärtsfallen des Kaninchens hervorruft, ist der negative Ausfall des Resultates mit Sicherheit wahrzunehmen.

Bulbocapnin stellten wir aus dem einheimischen *Tuber corydalis* dar und konnten die chemischen Angaben von Asahina und Yose (1919) bestätigen. Die farblosen schuppenförmigen Krystalle (Chlorhydrat) verfärben sich beim längeren Stehen grauweiss. Da Bulbocapnin (Merek), wenn die in die Ampulle gefüllte Lösung auch bräunlich verfärbt ist, keinen merkbaren Unterschied in bezug auf die biologische Wirkung erkennen lässt, haben wir bei unseren Versuchen manchmal auch das Merkeche

Präparat gebraucht. Die frisch bereitete Bulbocapninlösung bewirkt bei Kaninchen schon in der Dosis von 0,02 g pro kg (Konz. 0,2 g auf 10 ccm) deutliche Hypokinese. Wir haben mit 3-Astyl vorbehandelten Kaninchen 0,05 g pro kg Bulbocapnin nachträglich subkutan eingespritzt und keine additive Erscheinung konstatieren können. Bulbocapnin 0,1–0,15 g pro kg eingespritzt, ruft beim Kaninchen schreckliche Erscheinungen hervor: Nagetrieb, sogar Beissen seiner eigenen Vorderpfoten, profuse Speichelsekretion, ruckweise Zuckungen mit dem erhobenen Kopf und den klappenden Ohren, Rutschen nach hinten und krampfhaftes Hinüberfallen nach hinten, Seitenlage, alsbald Tod.

Es ist merkwürdig, dass die Wirkung des akinetisch-kataleptoide Erscheinungen hervorrufenden Bulbocapnin bei einer überschrittenen, tödlichen Dosierung der Vergiftung mit dem der chemischen Konstitution nach ganz verwandten Apomorphin ähnelt. Auch mit Novocain und Tutocain haben wir die Kombinationsversuche mit 3-Astyl angestellt und dabei ebenfalls die Additionserscheinung konstatiert. Jedenfalls steht es fest, dass Bulbocapnin in der Beziehung sich ganz anders verhält, wie die anderen von uns untersuchten amyostatischen Gifte. Inwieweit dabei Wesensverschiedenheit der Wirkungen obwaltet, steht die Antwort noch aus.

In bezug auf die letale Dosis ist auch die Additionserscheinung ganz augenfällig. Die Tatsache ist insofern praktisch von grosser Bedeutung, dass chemisch-konstitutionell verschiedene Lokalanästhetica bei der nacheinanderfolgenden Verwendung einer subletalen Dosis eventuell tödliche Vergiftung verursachen können. In der Beziehung ist Bulbocapnin auch nicht ganz indifferent. Durch die gleichzeitige Injektion der subletalen Dosis desselben kann die subletale Dosis der Lokalanästhetica zwar nicht so entschieden, so doch unter Umständen tödlich werden.

## Beschreibung der chemischen Versuche.

### I. SYNTHETISCHE VERSUCHE VON 3-AMINOHYDROCARBOSTYRIL.

Für diese Synthese ergab die Glycinanhydridmethode schon ein ganz zufriedenstellendes Resultat. Die Hydantoinmethode von Wheeler, die sich in meisten Fällen als ganz eklatant erweist, versagte bei der Kondensation mit o-Nitrobenzaldehyd. Es trat nämlich dabei starke Verharzung ein.\* Die Reaktionsmasse erstarrte nicht wie bei der Glycinanhydrid- und Hippursäuremethode. Nachdem wir kennen gelernt hatten, dass Diacetyl-glycinanhydrid weit reaktionsfähiger als Glycinanhydrid ist (H. Ueda, 1929), arbeiteten wir mit Acetylhydantoin sonst ganz nach der Vorschrift von Wheeler und konnten 3-Aminohydrocarbostyryl in einer guten Ausbeute gewinnen. Wir haben andererseits Hydantoin selbst zuerst eine Stunde mit Essigsäureanhydrid und wasserfreiem Natriumacetat bei 120° erhitzt und sodann nachträglich o-Nitrobenzaldehyd in wenig Eissessig aufgelöst zugesetzt und weiter einige Stunden erhitzt. Nach dem Erkalten erstarrte das Reaktionsgemisch in eine strahlig ausgespessete Krystallmasse. Aus diesem Kondensationsprodukte konnten wir zu unserem lebhaften Befremden mittelst Jodwasserstoffsäure 3-Amino-hydrocarbostyryl nicht gewinnen. Das aus siedendem Alkohol umkrystallisierte Kondensationsprodukt hat ein anderes Aussehen und einen weit niedrigeren Schmelzpunkt wie das aus Acetylhydantoin. Die Erforschung dieser eigenartigen Thatsache ist in unserem Laboratorium im Gang. Ebenso ging mit Acetylthiohydantoin und o-Nitrobenzaldehyd die Kondensation ganz glatt. Wir konnten das Kondensationsprodukt in guter Ausbeute analysenrein gewinnen. Die Entschwefelung (T. B. Johnson, G. M. Pfau und W. W. Hodge, 1912) desselben ging aber in diesem Fall äusserst schwierig von

---

\* Mit p-Nitrobenzaldehyd geht die Kondensation glatt: H. L. Wheeler und Ch. Hoffmann (1911). In Chem. Centralblatt das Kondensationsprodukt versehentlich als p-Nitrophenylhydantoin statt p-Nitrobenzalhydantoin, C. 82, I, 1859 (1911.).

statten. Auch durch die direkte Behandlung mit Jodwasserstoffsäure und auch mit Zinn und Salzsäure (T. B. Johnson und W. B. O'Brien, 1912) war die Ausbeute von 3-Aminohydrocarbostyryl sehr gering. Die Thiohydantoinmethode von Wheeler und Johnson muss in diesem Falle noch in mancher Hinsicht erforscht werden. 3-Amino-Körper direkt aus Hydrocarbostyryl zu synthetisieren, wird jetzt in unserem Laboratorium versucht, da Hydrocarbostyryl nunmehr durch die Untersuchung von Fr. Meyer, L. van Zütphen und H. Philipps (1927) auch aus Anilin und  $\beta$ -Chlorpropionsäure leichter zugänglich geworden ist.

Im folgenden sei vorerst die Darstellung von 3-Aminohydrocarbostyryl nach Erlenmeyer'scher Methode mitgeteilt. Pikrolonat, Flavianat und Chloroplatinat seien als Ergänzung der früheren Mitteilung beschrieben.

Die Mitteilung der anderen Darstellungsversuche sei für später vorbehalten.

#### *Kondensation der Hippersäure mit o-Nitrobenzaldehyd.*

Nach Erlenmeyer wurden 18,0 g Hippursäure, 15,0 g o-Nitrobenzaldehyd, 30,0 g Essigsäureanhydrid, 8,0 g wasserfreies Natriumacetat gut gemischt und auf dem Wasserbade eine Stunde lang erhitzt. Die erstarrte gelbe krystalline Reaktionsmasse wurde mit wenig kaltem Alkohol gewaschen und mit Wasser digeriert und abgesaugt, sodann sorgfältig mit Wasser und von neuem mit wenig Alkohol gewaschen. Die so gewonnene Substanz wog trocken 15,2 g, mithin 51,7% der Theorie. Die glänzenden, gelben Krystallplättchen sind unlöslich in Wasser, wenig in Alkohol, leichtlöslich in heissem Eisessig. F. 164–165°.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,0553 g Subst. : 0,1319 g CO<sub>2</sub>, 0,0193 g H<sub>2</sub>O.

0,0630 g „ : 5,3 ccm (24°, 746,4 mm.) N.

C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>. Ber. C. 65,28 H. 3,43 N. 9,53

Gef. C. 65,05 H. 3,91 N. 9,50

*Reduktion und Spaltung der o-Nitrobenzalhippursäure-azlaktone mit HJ.*

7,5 g Substanz wurden mit 70,0 cem HJ (D 1,7) und 3,0 g rotem Phosphor versetzt und unter Rückflusskühlung 5 Stunden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Reaktionsmasse mit Wasser verdünnt und abfiltriert. Das Filtrat wurde mehrmals mit Aether geschüttelt und von Benzoesäure befreit. Die wässrige Lösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, sodann mit konz. Natrolauge stark alkalisch gemacht. Ueber Nacht im Eisschrank stehen gelassen, schied sich der Hauptteil von 3-Aminohydrocarbostyryl krystallin aus. Nach dem Absaugen und Waschen mit kaltem Wasser wurde das Filtrat mittelst des Kumagawa-Sutoschen Flüssigkeitsextraktors mit Aether erschöpfend extrahiert. Das so gewonnene 3-Aminohydrocarbostyryl wog zusammen 3,6 g. Die Ausbeute betrug mithin ca. 87%.

0,0634 g Subst. : 9,9 cem (25°, 739,7 mm.) N.

$C_9H_{10}ON_2$  Ber. N. 17,29

Gef. „ 17,41

Der wie üblich dargestellte Benzoylkörper schmolz bei 205° und zeigte bei der Mischprobe mit der mittelst der Glycinanhydridmethode dargestellten analysenreinen Substanz keine Schmelzpunktdepression.

Pikrolonat: Gelbe Krystallnadeln. Sehr schwer löslich in Wasser und Alkohol, löslich in heissem Alkohol und Eisessig. Die Substanz hat keinen scharfen Schmelzpunkt, zersetzt sich bei ca. 225°.

0,0417 g Subst. (bei 100° getrocknet) : 7,4 cem (27,5°, 739,8 mm.) N.

$C_9H_{10}ON_2C_{10}H_8O_5N_4$  Ber. N. 19,72

Gef. „ 19,63

Flavianat: Feine gelbe Krystalle. Sehr schwer löslich in Wasser und Alkohol, etwas löslich in heissem Wasser. Die Substanz fängt bei ca. 160° an zusammenzusintern, bräunt sich allmählich,

um sich schliesslich bei ca. 265° zu zersetzen.

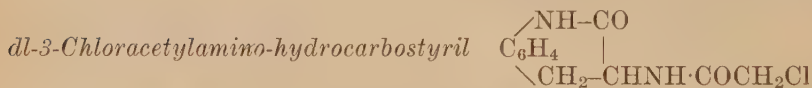
Zur Analyse wurde die Substanz aus heissem Wasser umkrystallisiert, bei 100° getrocknet.

0,1200 g Subst. :	0,0569 g BaSO <sub>4</sub>	
C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub> N <sub>4</sub> S	Ber. S.	6,73
	Gef. „	6,51

Chloroplatinat: Goldgelbe Krystalle. Schwer löslich in Wasser und Alkohol. Die Substanz verfärbt sich bei ca. 223°, zersetzt sich bei 235–236°.

0,1241 g Subst. (bei 100° getrocknet) :	0,0329 g Pt.	
(C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ON <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>	Ber. Pt	26,59
	Gef. „	26,52

## II. Synthese der N-substituierten Derivate des 3-Amino-hydrocarbostyrls.



10,0 g salzsaures 3-Aminohydrocarbostyrl wurden unter portionsweisem Zusatz von N-Natronlauge mit 7,0 g Chloracetylchlorid in ca. zehnfachem absolutem Aether wie üblich gekuppelt. Die ausgeschiedene farblose Krystallmasse wog trocken 11,5 g; mithin 96% der Theorie.

Zur Analyse wurde die Substanz aus Alkohol umkrystallisiert und bei 100° getrocknet.

0,0535 g Subst. :	0,1090 g CO <sub>2</sub> ,	0,0235 g H <sub>2</sub> O
0,0623 g „ :	5,3 ccm	n/10 NH <sub>3</sub>
0,0735 g „ :	0,0428 g	AgCl
C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> Cl	Ber. C. 55,33, H. 4,65, N. 11,75, Cl. 14,86	
	Gef. „ 55,57, „ 4,92, „ 11,92, „ 14,41	

Die seidenglänzenden, farblosen Krystalle schmelzen bei 224–225°. Sie sind unlöslich in Wasser, sehr wenig löslich in Aceton, Chloroform, Benzol etc., löslich in warmem Alkohol.

*dl.3-Glycylamino-hydrocarbostyryl.*

9,6 g fein pulverisierter Chloracetyl-Körper wurden mit 100,0 ccm Ammoniak (D. 0,9) versetzt, bei 100° in einem geschlossenen Rohr 1–2 Stunden erhitzt. Nach dem Abfiltrieren wurde das Filtrat unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde wiederum in Wasser aufgelöst, mit verd. Salzsäure angesäuert und mit Tierkohle behandelt und abfiltriert. Das Filtrat erstarrte zu einer Krystallmasse. Die abgesaugte, mit wenig Wasser und Alkohol ausgewaschene Substanz wog trocken 9,2 g. Die Ausbeute betrug mithin ca. 90%.

Zur Analyse wurde die Substanz aus verd. Alkohol umkrystallisiert und bei 100° getrocknet. F. ca. 254–255° unter Zersetzung.

0,0721 g Subst. : 8,3 ccm n/10 NH<sub>3</sub>

0,0982 g „ : 0,0534 g AgCl

C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Cl Ber. N. 16,44 Cl. 13,88

Gef. „ 16,13 „ 13,45

Um die freie Base zu gewinnen, wurden 2,5 g Chlorhydrat in wenig Wasser aufgelöst und mit konz. Natronlauge (0,8 g in möglichst wenig Wasser) versetzt. Nach und nach schieden sich weisse schuppenförmige Krystalle aus. Sie wurden sodann abgenutscht und mehrmals mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Die Krystalle wogen trocken 1,6 g und schmolzen bei 199–200°. Die Mutterlauge und das Waschwasser wurden mit Aether extrahiert. Dadurch liessen sich noch 0,4 g Krystalle gewinnen.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,0663 g Subst. : 0,1455 g CO<sub>2</sub>, 0,0375 g H<sub>2</sub>O

0,0505 g „ : 8,65 ccm (27°, 738,8 mm.) N.

C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub> Ber. C. 60,24, H. 5,98, N. 19,18

Gef. „ 59,85, „ 6,33, „ 18,95

Die Substanz ist löslich in Wasser, Alkohol, Chloroform, Aceton, unlöslich in Petroleumäther. Die wässrige Lösung reagiert alkalisch.

Benzoylkörper——3-(Hippuryl-amino)-hydrocarbostyryl; wie üblich aus Chlorhydrat dargestellt. F. 238–239°.

0,0679 g Subst. : 7,95 ccm (30°, 734,5 mm.) N.

C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub> Ber. N. 13,00

Gef. „ 12,76

*dl.3-Sarkosylamino-hydrocarbostyryl.*



7,1 g fein pulverisierter Chloracetyl-Körper wurden mit grossem Ueberschuss von wässriger 30%iger Methylaminlösung versetzt, eine Stunde lang bei 100° im geschlossenem Rohr erhitzt. Die Reaktionsmasse wurde weiter wie bei der Darstellung des Glycyl-Körpers behandelt. Das so gewonnene Chlorhydrat wog trocken 7,0 g. Aus der Mutterlauge liess sich noch eine geringe Menge Chlorhydrat gewinnen. F. ca. 257–258° unter Zersetzung.

Zur Analyse wurde die Substanz aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert und bei 100° getrocknet.

0,0670 g Subst. : 7,4 ccm n/10 NH<sub>3</sub>

0,1030 g „ : 0,0552 g AgCl

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Cl Ber. N. 15,58, Cl. 13,15

Gef. „ 15,47, „ 13,26

Um die freie Base zu gewinnen, wurden 3,0 g Chlorhydrat mit konz. Natronlauge wie beim Glycylkörper behandelt. Die gewonnenen Krystalle wurden zur weiteren Reinigung in wasserfreiem Chloroform aufgelöst und unter starker Kühlung mit Petroleumäther versetzt. Das Krystallpulver wog 2,0 g. Die Substanz ist leicht löslich in Wasser, Alkohol, Chloroform und Aceton, fast unlöslich in Petroleumäther. F. 164–165°.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,0704 g Subst.	:	0,1585 g CO <sub>2</sub> ,	0,0411 g H <sub>2</sub> O
0,0583 g „	:	9,65 ccm (30°, 735,0 mm.) N.	
C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	Ber.	C. 61,77, H. 6,49, N. 18,02	
	Gef.	„ 61,40, „ 6,53, „ 18,04	

*dl.3-(Aethylaminoacetyl-amino)-hydrocarbostyryl.*



7,2 g Chloracetylkörper wurden mit grossem Ueberschuss von wässriger 33%iger Aethylaminlösung versetzt, eine Stunde bei 100° im geschlossenen Rohr erhitzt. Im Gegensatz zu Glycyl- resp. Sarkosylkörper schied sich die freie Base nach dem Erkalten krystallin aus. Zur Reinigung wurden die abgenutzten Krystalle mit den aus Mutterlauge gewonnenen vereinigt und in verd. Salzsäure aufgelöst, sodann mit Ammoniak stark alkalisch gemacht, stehen gelassen. Die abgesaugten, sorgfältig gewaschenen Krystalle wogen trocken 6,8 g, mithin ca. 90% der Theorie.

Die Substanz ist sehr schwer löslich in Wasser löslich in Alkohol, Aceton und Chloroform, etwas löslich in Benzol und Aether. F. 149–150°.

Zur Analyse wurde die Substanz noch einmal aus verd. Alkohol umkrystallisiert und bei 100° getrocknet.

0,0921 g Subst.	:	0,2126 g CO <sub>2</sub> ,	0,0582 g H <sub>2</sub> O
0,0953 g „	:	14,5 ccm (30°, 739,6 mm.) N.	
C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	Ber.	C. 63,11, H. 6,93, N. 17,00	
	Gef.	„ 62,94, „ 7,07, „ 16,68	

Das wie üblich dargestellte Chlorhydrat (C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, HCl) ist leicht löslich in Wasser, löslich in Alkohol, kaum löslich in Aceton und Benzol, schmilzt bei ca. 264–265° unter Zersetzung.

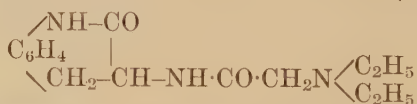
*dl.3-(Dimethylaminoacetyl-amino)-hydrocarbostyryl.*

9,6 g 3-(Chloracetyl-amino)-hydrocarbostyryl wurden mit 70,0 ccm 30%iger Dimethylaminlösung im geschlossenen Rohr eine Stunde bei 100° erhitzt. Mit der Zeit vermehrten sich die ausgeschiedenen Krystalle. Der ganze Rohrinhalt verwandelte sich schliesslich in einen Krystallbrei. Nach dem Erkalten wurde der Inhalt abgenutscht, gepresst, mit kaltem Wasser gewaschen, wog trocken 9,1 g; mithin die Ausbeute 90%. Die Substanz wurde aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Die glänzenden, schuppenförmigen Krystalle schmolzen bei 198–199°. Die Substanz ist löslich in Chloroform, Alkohol, Aceton, kaum löslich in kaltem Wasser, etwas löslich in heissem Wasser.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,0655 g Subst. :	0,1521 g CO <sub>2</sub> ,	0,0418 g H <sub>2</sub> O
0,0568 g „ :	8,7 ccm (27°, 741,2mm.) N.	
C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	Ber. C. 63,11, H. 6,94, N. 17,00	
	Gef. „ 63,33, „ 7,14, „ 16,97	

Das wie üblich dargestellte Chlorhydrat (C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, HCl) ist leicht löslich in Wasser, etwas löslich in warmem Alkohol, schwer löslich in Aceton, Chloroform und Benzol. F. ca. 262–263° unter Zersetzung.

*dl.3-(Diäthylamino-acetyl-amino)-hydrocarbostyryl.*

4,8 g 3-Chloracetyl-Körper wurden mit 35,0 ccm 30%iger wässriger Diäthylaminlösung im geschlossenen Rohr 1½ Stunden bei 100° erhitzt. Die ausgeschiedene ölige Masse verwandelt sich

nach dem Erkalten in schuppenförmige Krystalle. Die Ausbeute bestrug trocken 4,9 g; ca. 88% der Theorie. Die Substanz ist löslich in Chloroform, Alkohol, Aceton, sehr schwer löslich in Wasser, etwas löslich in heissem Wasser. F. 152°.

Zur Analyse wurde die Substanz aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, bei 100° getrocknet.

0,0668 g Subst. : 0,1601 g CO<sub>2</sub>, 0,0465 g H<sub>2</sub>O

0,0665 g „ : 9,1 ccm (26°, 744,2 mm.) N.

C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub> Ber. C. 65,41, H. 7,69, N. 15,27

Gef. „ 65,36, „ 7,79, „ 15,30

Das wie üblich dargestellte Chlorhydrat (C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, HCl) ist leicht löslich in Wasser und warmem Alkohol, kaum löslich in Aceton und Chloroform. F. ca. 223–224° unter Zersetzung.

#### LITERATUR.

- Araki, N. (1929): *Neurologia (Jap.)*, **31**, 57.  
Asahina, Y. u. Yose, M. (1919): *Journ. Pharm. Soc. Jap.*, **467**, 766.  
Beringer, K. (1928): *Der Nervenarzt*, **1**, 265.  
Braun, H. (1925): *Die örtliche Betäubung*. 7. Aufl. Leipzig.  
Braun, J. v. (1927): *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **60**, 345.  
Fischer, E. u. Kuzel, H. (1883): *Liebig's Ann.*, **221**, 282.  
Fournneau, E. (1921): *Préparation des médicaments organiques*, Paris.  
Frank, E., Stern, R. u. Nothmann, M. (1921): *Zeitschr. f. ges. exp. Med.*, **24**, 340. Hier auch ältere Literatur über Guanidinvergiftung.  
Gabriel, S. u. Zimmermann, J. (1879): *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **12**, 602.  
Guggenheim, (1913): *Biochem. Zeitschr.*, **51**, 369.  
Hayashi, N. (1930): *Mitt. med. Ges. Tokio*, **44**, 527.  
Herzog, I. (1930): *Arch. d. Pharmazie*, **268**, 271.  
Johnson, T. B. u. O'Brien, W. B. (1912): *Journ. of Biol. Chem.*, **12**, 205.  
Johnson, T. B., Pfau, G. M. u. Hodge, W. W. (1912): *Journ. Americ. Chem. Soc.*, **34**, 1041.  
Jong, H. de, (1929): *Nederl. Tijdschr. Geneesk.*, **1**, 640. (Cit. Zentralbl. f. d. ges. Neurol. u. Psych., **54**, 337).  
Jong, H. de, et Baruk, H. (1929): *Rev. neurol.*, **36** 21.  
Lotmar, F. (1926): *Die Stammganglien und die extrapyramidal-motor. Syndrome*. S. 44–45, Berlin.

- Macht, D. I. (1918): Journ. Pharm. and Exp. Therapeutics, **11**, 263.
- Magnus, R. (1924): Körperstellung, Berlin.
- Meyer, Fr., Zütphen, L. van u. Philipps, H. (1927): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **60**, 858.
- Morita, S. (1915): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., **78**, II. Mitt. S. 208, III. Mitt. S. 218.
- Pick, E. P. (1928): Dtsch. Zeitschr. f. Nervenhe., **106**, 245.
- Posner, Th (1912): Liebig's Ann., **389**, 44.
- Poullsson, E. (1919): Die Cocaingruppe in Heffter's Handbuch II, S. 103-172.
- Rademaker, G. G. J. (1926): Die Bedeutung der roten Kerne u. s. w., Berlin.
- Schaltenbrand, G. (1929): Dtsch. Zeitschr. f. Nervenhe., **108**, 209.
- Späth, E., Holter, H. u. Posega, R. (1928): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **61**, 322. Hier frühere Literatur.
- Spatz, H. (1927): Handb. d. norm. u. path. Phys. X. 350, Berlin.
- Spiegel, E. A. (1927): Der Tonus der Skelettmuskulatur, S. 82, Berlin.
- Strümpell, A. (1916): Dtsch. Zeitschr. f. Nervenhe., **54**, 240.
- Ueda, H. (1928): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **61**, 146.
- Ueda, H. (1929): Journ. Chem. Soc. Japan., **50**, 502.
- Watanabe, K. (1930): Journ. of Biochem., **12**, 70.
- Wheeler, H. L. and Hoffmann, Ch. (1911): Amer. Chem. Journ., **45**, 369.
- Yamakami, K. u. Kubo, T. (1924): Hokkaido-Igakkai-Zasshi, **2**, 1.
- Zipf, K. (1929): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., **140**, 57.

## ZUR KENNTNIS DER VERGLEICHENDEN BIOCHEMIE.

### VII. Zur Chemie der besonderen Saké-Hefen.

VON

JUN-ICHIRO SAGARA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät  
in Nagasaki. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 14. Oktober 1930)

Die Kenntnis der Stoffe, aus welchen sich die Zelle zusammensetzt, bildet die Grundlage für das Verständnis der in der Zelle verlaufenden chemischen Vorgänge. Nicht nur die Quantität, sondern auch die Zusammensetzung der bei der alkoholischen Gärung oder bei dem Fäulnisvorgänge entstehenden Stoffwechselprodukte hängt nach allen bisher vorliegenden Beobachtungen von der Beschaffenheit des zur Verfügung stehenden Materials, von der Art der Hefe und von der Anwesenheit bestimmter Bakterienarten ab. Die Feststellung der chemischen Zusammensetzung der Mikroorganismen ist somit speziell vom medizinischen Standpunkt wichtig, insofern sie uns eine Aufklärung bieten kann über die Beziehungen, in welche diese Organismen zum Leben der höheren organischen Wesen treten, insbesondere über die Lebensbedingungen und das Wachstum der Hefe und der Bakterien selbst, über die Natur der Gifte und der Immunstoffe, die sie erzeugen.

Dass die Einwirkung von Saké-Hefen, und zwar von einer Art wie Willia, bei B-Avitaminose zur Heilung führte, während Saké-Hefe A. Nr. 37 und Saké-Hefe A. Nr. 38 sehr augenfällige interessante Symptome hervorgerufen haben, die an die Beriberi des Menschen erinnerten, wurde schon vor einigen Jahren im hiesigen Institut festgestellt (1926).

Nachdem dies erkannt worden war, traten die Fragen auf: a. Prägen sich die biologischen Eigenschaften beider Hefen in ihrer chemischen Zusammensetzung aus? b. Wie weit lassen sich die spezifischen Funktionen der verschiedenen Saké-Hefen durch die Wirkungen der darin vorhandenen Fermente erklären?

Wenn sich eine Verschiedenheit der chemischen Zusammensetzung und der fermentativen Wirkung je nach der Arten der Saké-Hefen erkennen lässt, so folgt daraus die Bedeutung der chemischen Natur der Saké-Hefen sowohl für ihre medizinische Wirkung als auch für ihre Klassifikation. Hierzu einen Beitrag zu liefern, ist der Zweck der nachstehenden Untersuchung.

#### MATERIAL.

Für die Untersuchungen wurden die beiden folgenden Hefearten benutzt:

1. *Saccharomyces* Saké A. Nr. 37.
2. *Saccharomyces* Saké A. Nr. 38.

Die Hauptschwierigkeit, die sich der chemischen Untersuchung des Hefenkörpers in den Weg stellt, ist die Gewinnung ausreichender Mengen. Für die beiden Saké-Hefen ermöglichte es die Kultivierung auf Hayduck's Nährlösung, die Hefenmassen ganz rein ohne Beimengung von Nährboden und zwar in grossen Mengen zu erhalten. Die Kulturen setzte ich in mit Wattepfropfen abgeschlossenen Epreuvetten an, nachdem die Nährlösung durch wiederholtes Aufkochen zuvor sterilisiert worden war. Nach 3–4 tägigem Stehenlassen bei 20–25° sind die Hefen zu einem dicken Häutchen ausgewachsen. Die mit Platindraht vorsichtig gesammelte Hefemasse wurde zunächst auf der Glasplatte und dann im Exsiccator völlig getrocknet.

Mit diesem Material habe ich nach dem von Tamura (1913) bei Bakterien und von Yamaguchi (1919) bei Schimmelpilz angewendeten Verfahren die chemische Zusammensetzung und die fermentative Wirkung der oben erwähnten Saké-Hefen untersucht.

## LIPOIDE STOFFE.

100 g im Exsiccator getrocknetes Hefepulver wurden mit Äther mittels des Soxhlet'schen Apparates extrahiert. Dann wurde der Rückstand mit 94%igem Alkohol unter Anwendung des Rückflusskühlers in der Wärme erschöpfend extrahiert. Die Menge der lipoiden Stoffe ist nicht gross, und es war deshalb sehr schwierig, an ihnen eine eingehendere chemische Untersuchung der Lipide auszuführen. Immerhin konnte ich feststellen, dass in allen Fraktionen der lipoiden Stoffe von beiden Saké-Hefen keine Cholesterinreaktionen zu erhalten sind.

Der aetherische Extrakt wurde bei niedriger Temperatur eingedampft. Der so erhaltene Rückstand wog 1,8 g. Damit wurde die Verseifungszahl ermittelt:

Saccharomyces Saké A. Nr. 37      180,

Saccharomyces Saké A. Nr. 38      182.

Der alkoholische Extrakt wurde nach Angabe von älteren Autoren behandelt und schliesslich mit Aceton gefällt. Die Acetonfällung wurde getrocknet (2,0 g).

0,1501 g Substanz, nach Neumann auf Phosphor untersucht, verbrauchten

9,15 ccm n/2-Natronlauge      3,37% P,

0,1302 g Substanz, nach Kjeldahl auf Stickstoff untersucht, verbrauchten

3,3 ccm n/10-Schwefelsäure 3,53% N.

Das Verhältnis P:N beträgt 1:2,52. Hieraus geht hervor, dass Saccharomyces Saké A. Nr. 37 und Nr. 38 wahrscheinlich kein Lecithin besitzen. Vielmehr kann man aus den Analysen vermuten, dass hier ein Triamino-oder Diamino-monophosphatid vorliegt.

## KOHLENHYDRATE.

Die durch Aether und Alkohol möglichst entfetteten Hefen wurden mit einer Mischung von zwei Teilen Schwefelsäure und einem Teil Wasser gründlich zerrieben. Die dabei entstandenen

sirupösen Lösungen wurden mit grossen Mengen Wassers verdünnt. Dadurch gingen alle Kohlehydrate, welche die Orcin-Salzsäure-Reaktion zeigten, in Lösung, während die Eiweisskörper als weisser flockiger Niederschlag gefällt waren. Die von der Eiweissmasse abfiltrierten klaren Lösungen wurden mittels Baryt von der Schwefelsäure befreit und sodann zur Sirupkonsistenz eingedampft. Diese sirupöse Masse wurde mit der dreifachen Menge absoluten Alkohols auf dem Wasserbade ausgekocht. Die Lösung wurde abgekühlt und jetzt filtriert.

Diese Alkohollösung enthielt eine Substanz, die die Tollenssche Orcin-Salzsäure-Reaktion zeigte und Kupferoxydlösung in alkalischer Reaktion reduzierte, woraus auf das Vorhandensein von Pentosen zu schliessen ist. Die in Alkohol unlösliche Masse besitzt kein Reduktionsvermögen und bildet kein Osazon.

Andererseits konnte ich einen schön krystallisierbaren Kohlehydratstoff gewinnen, dessen Konstitution jedoch noch nicht konstatiert ist. Nach langen Stehenlassen des eingeeengten alkoholischen Auszuges der getrockneten Hefemasse (*Saccharomyces Saké* A. Nr. 37) im Eisschrank schieden sich nämlich schöne, rhombische Prismen aus. Sie waren in Wasser leicht, in Alkohol wenig löslich, in Äther und anderen organischen Solventien unlöslich. Ferner waren die Krystalle stickstofffrei und schmolzen bei scharf 103°. Die gegen Lackmus schwach sauer reagierende wässrige Lösung löste Kupferoxydhydrat, ohne es beim Kochen zu reduzieren, schmeckte schwach süss und gab keine Pentoserektion. Nach dem Kochen mit Salzsäure fiel die Trommersche Reaktion stark positiv aus.

Sie ergab folgende Analysenzahlen:

0,1311 g Substanz gaben 0,1974 g CO<sub>2</sub> und 0,0768 g H<sub>2</sub>O.

Gefunden: 41,06% C, 6,55% H.

Die Molekulargewichtsbestimmung nach der Beckmannschen Gefriermethode ergab den folgenden Wert:

M. 319,7

Genauere Angaben über die Natur der Substanz können ihrer

zu kleinen Menge wegen nicht gemacht werden, doch wird vermutet, dass es sich um eine der Biose nahe verwandte Verbindung handelt.

#### DIE NUKLEIN- UND PROTEINBAUSTEINE.

70 g entfettete Hefemasse wurden mit Schwefelsäure hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit Bariumcarbonat versetzt, bis der Prozentgehalt der Schwefelsäure 5% betrug, und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Aus der regenerierten Basenlösung wurden die Nukleinbasen mit Silbernitrat in salpetersaurer Reaktion gefällt. Das Filtrat der Purinbasenfällung wurde mittels Silber-Baryt-Verfahren von Kossel (1900–1922) auf Hexonbasen verarbeitet. Das Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung wurde mit Baryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure befreit, der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt, und dann eingengt. Aus dieser Lösung wurden Monoaminosäuren isoliert.

Aus der Purinbasenfraction wurde das Adenin als Pikrat isoliert. Von Guanin, Xanthin und Hypoxanthin wurde nur der Stickstoff bestimmt, weil die Menge sehr klein war.

Von den Hexonbasen wurde das Histidin in das Pikrolonat, das Arginin und Lysin in das Pikrat übergeführt.

Aus der Monoaminosäurefraktion wurde Phenylalanin in einer Menge von 1,1–2,0 g krystallisiert gewonnen; auch dies Präparat gab keine Millonsche Reaktion. Durch Alkoholextraktion wurden etwa 6 g Prolin dargestellt. Valin wurde durch Methylalkohol extrahiert und wog nach der Reinigung ca. 4 g. Die übrigen Monoaminosäuren waren an Menge sehr gering und wurden nicht untersucht.

Alle Zahlen der ermittelten Substanzen sind aus der Tabelle I zu ersehen.

#### ÜBER DIE NUKLEINSÄURE.

Zur Darstellung der Hefenukleinsäure bemerkte K. Kowalewski (1910), dass die Altmannsche Methode zweckmässiger sei als die

TABELLE I.

Gefundene Substanz	in 70 g getrocknete Hefemasse		Berechnet auf 100 g Hefemasse	
	Saké-Hefe A. Nr. 37. g	Saké-Hefe A. Nr. 38. g	Saké-Hefe A. Nr. 37. g	Saké-Hefe A. Nr. 38. g
Arginin	0,35	0,33	0,50	0,47
Histidin	0,18	0,22	0,26	0,31
Lysin	0,39	0,34	0,56	0,48
Ammoniak-N.	0,0523	0,0631	0,0747	0,0901
Phenylalanin	1,10	2,10	1,57	3,00
Prolin	6,20	5,80	8,85	8,28
Valin	3,30	4,10	5,42	5,85
Adenin	0,11	0,17	0,15	0,24
Guanin-N.	0,0022	0,0033	0,0031	0,0047
Xanthin- u. Hypoxanthin-N.	0 0267	0,0347	0,0381	0,0494

Neumannsche, welche letztere allgemein in Gebrauch ist. Bei meiner Untersuchung der Saké-Hefen wurde die Nukleinsäure daher nach Altmann dargestellt.

40 g entfettete Hefemasse wurden mit 150 ccm Wasser gut zerrieben, dann mit 850 ccm Wasser angerührt. Nach dem Zusatz von 90 ccm 33%iger Natronlauge unter Umrührung wurde das Gemisch mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert und dann mit soviel Essigsäure versetzt, dass die Reaktion stark sauer war. Nach 24 stündigem Stehen wurde der Niederschlag abzentrifugiert, die klare Flüssigkeit mit Soda genau neutralisiert und bis auf 200 ccm auf dem Wasserbade eingedampft, die eingeengte Flüssigkeit mit dem 2 fachen Volumen 94%igen Alkohols, dessen Gehalt an Salzsäure 3% war, gefällt. Am folgenden Tage wurde die Flüssigkeit von dem Niederschlage abgegossen, der Niederschlag wieder in wenig Wasser gelöst, vom Ungelösten abzentrifugiert, und die klare wässrige Lösung mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt. Der

Niederschlag wurde mit absolutem Alkohol entwässert und dann mit Aether gewaschen. Ausbeute 3,6 g.

Für die Stickstoff- und Phosphorbestimmung wurde die Substanz bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1302 g Substanz verbrauchten, nach Kjeldahl verascht,  
3,3 ccm N/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>     3,53% N.

0,1501 g Substanz verbrauchten, nach Neumann auf Phosphor untersucht, 9,15 ccm N/2-NaOH     3,37% P.

Es ist merkwürdig, dass der Gehalt der von mir dargestellten Nukleinsäure an P und N im Vergleich mit der von anderer Herkunft ausgesprochen niedriger ist.

Eine wässrige Lösung reduzierte Fehlingsche Lösung nicht. Nach dem Kochen mit verdünnter Salzsäure aber war die Reduktion deutlich und die Orcin-Salzsäure-Reaktion fiel stark positiv aus.

Um die Bausteine der Saké-Hefenukleinsäure zu erkennen muss man zunächst Spaltungsversuche unternehmen.

3 g nach Altmann dargestelltes nukleinsaures Natrium von Saké-Hefe A. Nr. 37 wurden mit 30 ccm 20%iger Schwefelsäure 12 Stunden lang auf dem Sandbade gekocht. Die von der dabei ausgeschiedenen Huminsubstanz abfiltrierte dunkelbraune Flüssigkeit wurde mit Äther mittels Extraktionsapparates erschöpft, und der Ätherextrakt eingedampft. Aus der konzentrierten ätherischen Lösung schied sich eine krystallisierte Substanz aus (0,1 g). Aus Wasser unter Anwendung von Tirkohle umkrystallisiert, war sie vollkommen farblos und stellte schöne nadelförmige Krystalle dar. Ihre wässrige Lösung reagierte sehr stark sauer und gab ein schwer lösliches Calciumsalz. Die Eigenschaften stimmen also mit denen der Oxalsäure überein.

Der schwefelsaure wässrige Rückstand der Aetherextraktion wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die Phosphorwolframsäurefällung wurde auf die bekannte Weise mit Baryt behandelt, und die regenerierte Basenlösung mit Salpetersäure angesäuert und mit Silbernitratlösung ausgefällt. Der Niederschlag wurde

zuerst auf einem Filter gesammelt, dann auf der Nutsche abgesaugt und mit ammoniakhaltigem Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat keine Salpetersäurereaktion mehr gab. Dann wurde der Niederschlag in heissem Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das von Schwefelsilber abfiltrierte Filtrat wurde abgedampft. Eine kleine Probe zeigte eine deutliche Xanthinprobe.

Aus dem Hauptteil der Lösung wurde das Adenin als Pikrat isoliert. Das aus Wasser umkrystallisierte Pikrat, dessen Schmelzpunkt bei  $280^{\circ}\text{C}$  lag, betrug ca. 0,27 g.

Das Hypoxanthin wurde in salpetersaures Hypoxanthinsilber übergeführt und durch seine mikroskopisch charakteristische Krystallform identifiziert.

#### DIE ANORGANISCHEN BESTANDTEILE.

Mit Äther und Alkohol völlig entfettete Hefemasse wurde auf die bekannte Weise verascht. Um die gegenseitigen Mengenverhältnisse der wasserlöslichen und wasserunlöslichen Aschenbestandteile festzustellen, habe ich die Asche zunächst mit Wasser extrahiert. Der Wasserauszug, worin die in Wasser löslichen Aschenbestandteile enthalten waren, wurde auf dem Wasserbade eingeeengt, sein Volumen durch Auffüllen in einem geaichten Messkolben bestimmt, ein aliquoter Teil davon für die Bestimmungen der einzelnen Stoffe entnommen, und die dabei gefundenen Werte der Stoffe auf das Gesamtvolumen des Wasserauszugs umgerechnet.

Die in Wasser nicht löslichen Aschenbestandteile löste ich in verdünnter Salzsäure, verdünnte mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen und verwendete einen aliquoten Teil zu Bestimmungen der alkalischen Erden, der Schwefelsäure und der Phosphorsäure. Die Mengen der in Frage stehenden Stoffe sind zu denjenigen der im Wasserauszuge vorhandenen gleichnamigen Stoffe addiert, und der Einfachheit halber ist nur ihre Summe in Tabelle II eingetragen. Der in Salzsäure nicht lösliche Rückstand wurde nach

TABELLE II.

Hefearten	Saké-Hefe A. Nr. 37		Saké-Hefe A. Nr. 38	
Menge des verwendeten Materials	29,6054 g		22,4288 g	
Aschenmenge	in g	in %	in g	in %
Gesamtasche	2,0785	7,02	1,5766	7,02
H <sub>2</sub> O lösl.	1,3921	4,70	1,0827	4,84
H <sub>2</sub> O unlösl.	0,6864	2,32	0,4894	2,18
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,9122	3,08	0,5308	2,36
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1225	0,41	0,1050	0,46
SiO <sub>2</sub>	0,1436	0,48	0,1251	0,55
Cl	0,4879	1,64	0,4417	1,96
K <sub>2</sub> O	0,0940	0,31	0,0710	0,31
Na <sub>2</sub> O	0,0717	0,24	0,0782	0,34
CaO	0,0126	0,04	0,0084	0,03
MgO	0,1195	0,40	0,0688	0,30

dem Verfahren von M. Gonnermann (1917) auf Kieselsäure verarbeitet.

Zur Bestimmung des Chlors bediente ich mich der Methode von Volhard. Die Schwefelsäure wurde durch Salzsäure und Bariumchlorid gefällt und als Bariumsulfat abgewogen. Die Phosphorsäure wurde zuerst mit Magnesiamischung in der Kälte gefällt und dann auf bekannte Weise in das Phosphorsäuremolybdat übergeführt. Hierin wurde sodann die Phosphorsäure nach der Vorschrift von Neumann titrimetrisch bestimmt. Der Kalk wurde aus einer mit essigsäurem Natron versetzten Lösung durch oxalsaures Ammon als oxalsaurer Kalk gefällt, durch starkes Glühen in Aetzkalk übergeführt und dann gewogen. Aus der vom Calciumoxalat abfiltrierten Lösung fällte ich das Magnesium durch Übersättigung mit Aetzammoniak als phosphorsaure Ammonmagnesia

aus, verwandelte die letztere auf die übliche Weise durch Glühen in pyrophosphorsaure Magnesia und berechnete aus der gewogenen pyrophosphorsauren Magnesia die Magnesia. Zur Bestimmung des Kaliums und des Natriums wurden die beiden Alkalien nach möglichster Entfernung der anderen Aschenbestandteile in Chloride übergeführt, als solche gewogen, und dann das Kalium als Kaliumplatinchlorid bestimmt. Durch Subtraktion des Chlorkaliums von dem vorher gefundenen Gewichte der Summe der beiden Chloralkalien wurde die Menge des Chlornatriums gefunden.

#### FERMENTE.

Um die Frage, wie weit sich die spezifischen Funktionen der verschiedenen Saké-Hefen durch die Wirkungen der darin vorhandenen Fermente erklären lassen, auf dem experimentellen Wege zu entscheiden, habe ich zunächst das Studium der Fermente bei der Saké-Hefe A. Nr. 37 und 38 unternommen. Unter verschiedenen Fermenten wurden hier Amylase, Esterase, Urease, Glycerophosphatase, Pepsin und Trypsin untersucht.

Frische Hefemasse wurde mit Wasser gut angerührt. Die wässrige Lösung wurde in zwei gleiche Portionen geteilt, wovon die eine mit der Substratlösung gemischt und unter Zusatz von Puffer und Toluol bei 29° digeriert wurde. Die andere Portion wurde jedesmal unter Innehaltung identischer Bedingungen für die Kontrollversuche verwendet. Die Reaktion der Lösung wurde mit Salzsäure und Natronlauge reguliert, und die Wasserstoffionenkonzentration durch Gaskettenmethode bestimmt.

Bei der Untersuchung von Amylase wurde 1%ige Dextrinlösung als Substrat verwendet. Der gespaltene Zucker wurde nach Bertrand ermittelt. Esterasewirkung in dem Versuchsmaterial habe ich nach Rona-Michaelissem Verfahren mit Monobutyrin untersucht. Bei der Ureaseuntersuchung benutzte ich 10%ige Urealösung als Substrat und Phosphatgemisch nach Sørensen als Pufferlösung. Glycerophosphatasewirkung in dem Versuchsmaterial habe ich nach Neuberg und Karezag mit glycerinphosphorsauem

Natrium untersucht. Beim Versuche betreffend Pepsin- und Trypsinwirkung wurden die Pufferlösungen von Clark und Lubs benutzt. Ich habe nämlich bei der Untersuchung der Pepsinwirkung das Kaliumchlorid-Salzsäuregemisch und beim Trypsinversuche das Borsäure-Natron-Puffergemisch verwendet. In beiden Fällen wurden 0,3 g Eialbumin als Substrat benutzt.

Es zeigte sich dabei, dass die Amylase- und Esterasewirkung bei neutraler Reaktion hervortraten, und dass die Trypsinwirkung bei schwach alkalischer Reaktion deutlich zutage trat, während eine starke Wirkung von Glycerophosphatase in schwach saurer, und eine Pepsinwirkung in stark saurer Reaktion zu beobachten waren. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Fermenten war die Wirkung der Urease mit dieser Methode nicht nachweisbar. Ob die Urease in den beiden Saké-Hefen festgehalten ist und erst dann zur Wirkung kommt, wenn sie in bestimmter Weise aus Zellen zum Austritt gebracht wird, oder ob sie überhaupt in beiden Hefen nicht vorhanden ist, ist noch nicht festgestellt.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen sind in der Tabelle III kurz schematisch verzeichnet.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Zum Schluss mögen einige der wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen noch einmal hervorgehoben werden:

1. Bei beiden Saké-Hefen zeigte sich eine auffallende Übereinstimmung in den organischen und in den anorganischen Bestandteilen.

2. Lecithin wurde nicht aufgefunden, dagegen ein Phosphatid, welches durch seinen höheren Gehalt an Stickstoff als Triamino- oder Diamino-monophosphatid angenommen werden kann.

3. Das Vorhandensein einer Pentose ist festgestellt.

4. Eine der Biose nahe verwandte sauer reagirende Substanz wurde rein krystallinisch isoliert.

5. Unter den Eiweissbausteinen wurden die folgenden Amino-

TABELLE III.

Arten der Fermente	Digestionsdauer	pH	Versuchsmaterial	
			Saké-Hefe A. Nr. 37	Saké-Hefe A. Nr. 38
Amylase	24 Std.	6,8	+	+
		7,4	++	++
		8,0	+	+
Esterase	3 Std.	6,2	+	+
		7,2	++	++
		7,7	+	+
Urease	3 Std.	6,8	(-)	(-)
		7,2	(-)	(-)
		8,0	(-)	(-)
Glycero-phosphatase	48 Std.	5,6	+++	+++
Pepsin	7 Tage	1,8	+	+
		2,0	++	++
		2,2	+++	+++
Trypsin	7 Tage	8,0	+	+
		8,2	+++	+++
		8,4	+	+

säuren gefunden: Arginin, Histidin, Lysin, Phenylalanin, Prolin und Valin.

In quantitativer Hinsicht ist das Überwiegen des Phenylalanins und des Prolins unter den Proteinbausteinen bemerkenswert.

6. Wie bei der Schimmelpilznukleinsäure zeichnet sich die Nukleinsäure beider Saké-Hefen durch den niedrigeren Gehalt an P und N aus, im Vergleich mit den anderen bisher bekannten Nukleinsäuren von verschiedener Herkunft.

7. Die anorganischen Bestandteile der Zellen von beiden Saké-Hefen sind quantitativ ermittelt.

8. In beiden Hefen sind Amylase, Esterase, Glycerophosphatase, Pepsin und Trypsin vorhanden.

Die Frage, bis zu welchem Grade sich die Spezieseseigentümlichkeiten und die biologischen Eigenschaften verschiedener Saké-Hefen in ihrer chemischen Zusammensetzung ausprägen, lässt sich erst dann vollständig entscheiden, wenn es gelingt, alle Zellbau-

steine zu isolieren und sowohl qualitativ wie auch quantitativ zu vergleichen.

Unsere Untersuchungen müssen daher weiter fortgesetzt werden.

Für die gütige Überlassung der Hefeproben bin ich zum Schluss Herrn Professor T. Takahashi in der agrikulturischen Fakultät der Universität Tokyo zum grössten Dank verpflichtet.

#### LITERATUR.

- Gonnermann, M. (1917): Zs. f. physiol. Chem., **99**, 256.  
Kossel, A. (1906): Zs. f. physiol. Chem., **49**, 318.  
Kossel, A. und Edlbacher, S. (1920): Zs. f. physiol. Chem., **110**, 241  
Kowalewski, K. (1910): Zs. f. physiol. Chem., **69**, 240.  
Tamura, S. (1913,i): Zs. f. physiol. Chem., **87**, 85.  
Tamura, S. (1913,ii): Zs. f. physiol. Chem., **88**, 190.  
Tamura, S. (1914,i): Zs. f. physiol. Chem., **89**, 289.  
Tamura, S. (1914,ii): Zs. f. physiol. Chem., **89**, 304.  
Tomita, M., Komori, Y. u. Sendju, Y. (1926): Zs. f. physiol. Chem., **158**, 80.  
Yamaguchi, K. (1919): Kyoto Igaku Zassi, **16**, 23.



## ÜBER DIE SPALTUNGSPRODUKTE DES KAPSELEIWEISSES VON HEMIFUSUS TUBA GMEL.

VON

JUN-ICHIRO SAGARA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät  
in Nagasaki. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 14. Oktober 1930)

Die marinen Gastropoden bergen eine Anzahl Eier in je einer Kapsel. Diese Kapseln sind von ganz verschiedener Gestalt: Urnen, flache Dosen, die in Reihen oder Haufen angeordnet sind. Die von *Hemifusus tuba* Gmel. sind flach, bikonvex, derb, in grossen Mengen in Reihen angeordnet. Sie werden bei uns von den Kindern als Spielzeug benutzt. Sie sind durch eine grosse Resistenz gegen die proteinlösenden Reagenzien oder gegen chemische Agenzien ausgezeichnet.

Um Aufschluss über die Konstitution der Kapseln zu erlangen, habe ich, wie allgemein bei Proteinstoffen, die Hydrolyse durch Säuren benützt.

Als Spaltungsprodukte der Eikapsel von *Hemifusus tuba* Gmel. wurden mit Sicherheit nachgewiesen: Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Arginin und Lysin.

Für die Isolierung der Monoaminosäuren wurden 100 g Versuchsmaterial mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert und hierauf nach der von Emil Fischer (1901) angegebenen Methode verestert. Die in Freiheit gesetzten Ester wurden durch fraktionierte Destillation getrennt und dann auf bekannte Weise verseift. Die Trennung der einzelnen Aminosäuren wurde durch ihre verschiedene Löslichkeit, und zwar die ihrer Kupfersalze vervollständigt.

Für die Trennung der Hexonbasen wurden 100 g Material mit Schwefelsäure hydrolysiert. Die weitere Behandlung führt man

nach Angabe von Kossel (1900–1922) aus und isoliert die einzelnen Diaminosäuren.

Die Gesamtmenge der aus der Eikapsel von *Hemifusus tuba* Gmel. isolierten Aminosäuren betrug für 100 g Material

Glykokoll	?
Alanin	1,62 g
Valin	0,65 g
Leucin	20,72 g
Isoleucin	1,60 g
Prolin	0,76 g
Phenylalanin	0,54 g
Tyrosin	?
Asparaginsäure	spur
Glutaminsäure	9,10 g
Arginin	3,11 g
Lysin	4,97 g
Histidin	?

In quantitativer Hinsicht ist das Überwiegen des Leucins und der Glutaminsäure unter den Proteinbausteinen bemerkenswert. Es ist auch eigentümlich, dass die nichthydroxylierten aromatischen Atomkomplexe in weit grösserer Zahl vertreten sind, als die hydroxylierten. Glykokoll liess sich keines nachweisen.

Es zeigte sich also, dass das Kapseleiweiss von *Hemifusus tuba* Gmel. zu einem Albumoid gehört und einerseits dem Keratin, andererseits dem Elastin nahesteht.

#### LITERATUR.

Fischer, E. (1901): Zs. f. physiol. Chem., **33**, 151.

Kossel, A. (1906): Zs. f. physiol. Chem., **49**, 318.

Kossel, A und Edlbacher, S. (1920): Zs. f. physiol. Chem., **110**, 241.

## BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER NATUR DES NACH EINNAHME VON CHLOROPHYLL IM URIN AUFTRETENDEN PORPHYRINS.

VON

YASUO NAKAMURA.

(Aus dem Nakamura-Spital in Seto, Nagasaki.)

(Eingegangen am 14. Oktober 1930)

Im menschlichen und tierischen Urin tritt nach Genuss von rohem Fleisch oder von grünem Gemüse eine rötlicher Farbstoff auf, der in ursächlichem Zusammenhang mit dem genossenen Fleisch oder Chlorophyll steht. Hopkins (1895) und Stokwis (1899) nahmen diesen Farbstoff als Hämatoporphyrin an; dem stellten sich andere entgegen, die diesen Farbstoff nicht für Hämatoporphyrin hielten. Ein ähnlicher Farbstoff tritt auf nach Vergiftungen mit Schlafmitteln aus der Sulfonalreihe. Auch dieser Farbstoff wurde einerseits für Hämatoporphyrin gehalten, obsehon andererseits manche Beobachter auf Unterschiede im Verhalten beider Farbstoffe hinwiesen.

Dass im Urin nach Genus von rohem Fleisch oder von grünen Gemüsen ein ähnlicher Farbstoff auftritt, dürfte eine ausreichende Stütze sein für die Meinung Bürgis (1916), sofern dieselbe noch gestützt zu werden braucht, dass der Blutfarbstoff und der Blattfarbstoff in naher genetischer Beziehung zueinander stehen. Haben doch sowohl der Blutfarbstoff wie auch der Blattfarbstoff den gleichen Viererkomplex. Bürgi und seine Schüler (1925) konnten feststellen, dass nach Genuss von extrahiertem Chlorophyll der Farbstoff im Urin zu finden ist und zwar sogar während einer längeren Zeit nach der Chlorophylleinnahme.

Mich interessierte vor allem die Frage, was eigentlich dieser Farbstoff sei. Dass ich an die Identifizierung durch die Elementaranalyse nicht denken durfte, war von vornherein klar, da die Spuren des Farbstoffes, die im Urin ausgeschieden werden, zu minim

sind, als dass man mit ihnen eine genaue Farbstoffanalyse vornehmen könnte. Ich suchte deswegen durch andere, unten zitierte Methoden etwas Klarheit in die Frage zu bringen.

Für meine Versuche verwendete ich teils Kaninchen, teils wurden die Versuche an mir selbst ausgeführt. Für einige Versuche stellten sich mir dankenswerterweise einige Herren zur Verfügung.

## I. UNTERSUCHUNG DES HARNFARBSTOFFES BEI DER CHLOROPHYLLFÜTTERUNG.

### A. *An Kaninchen.*

Für diese Untersuchungen verwendete ich 3 Kaninchen, im Mittel etwas über 2 kg schwer. Ich gab den Tieren die ersten 2 Tage je 0,01 g Chlorophyll löslich pro kg Gewicht subkutan, dann fing ich an ihnen täglich je 0,1 g pro kg Gewicht in das Trinkwasser zu mischen.

Für den Nachweis des Farbstoffes verwendete ich folgende Methoden nebeneinander:

1. Nach Salkowski (1891): Zu 30 bis 50 ccm Urin setzt man alkalische Chlorbaryumlösung bis zur völligen Fällung zu. Der Niederschlag wird mit Wasser und hernach mit absolutem Alkohol ausgewaschen. Die Extraktion des Hämatoporphyrins geschieht mittels Behandlung des Rückstandes mit salzsäurehaltigem Alkohol. Die Lösung ist rotviolett und gibt spektroskopisch die zwei Hämatoporphyrinstreifen. Uebersättigt man mit Ammoniak, so wird die Flüssigkeit gelblich, und spektroskopisch erhält man die bekannten Streifen.

2. Verfahren Garrod (1895): Phosphatreicher Harn wird mit  $1/5$  Volumen einer 10%igen Natronlauge versetzt und filtriert. Der Niederschlag wird mit Wasser und dann mit Alkohol ausgewaschen. Zum ausgewaschenen Niederschlag setzt man einen konzentrierte Salzsäure enthaltenden Alkohol, verrührt gut und filtriert hierauf die Lösung. Das Filtrat wird zur spektroskopischen Untersuchung verwendet.

3. Bleiprobe: 200–300 ccm sauren Urins wurden unter Umrühren mit Bleiacetat versetzt, bis nach dem Absetzen des Niederschlages die darüber stehende Flüssigkeit klar geworden war. Der Niederschlag wurde auf einen Faltenfilter gebracht, mit Wasser und Alkohol gewaschen, einige Stunden stehen gelassen, dann in eine Porzellanschale gebracht, mit ca. 20 ccm salzsäurehaltigem Alkohol digeriert und die Lösung vom Rückstand durch Filtration getrennt.

Meine Befunde können kurz wie in Tabelle I zusammengestellt werden.

TABELLE I.

Chlorophyll- menge pro Tier.	Harn- menge	Harn- beschaffen- heit	Methode	Farbe	Fluo- reszenz	Spektrum
0,01 g Injektion	300 ccm	Bräunlich getrübt sauer	Salkow- ski.	Gelblich	(-)	(-)
0,01 g „ „	280 ccm	„	Garod.	Bräunlich	(-)	Urobilin- spektrum
0,1 g per os	280 ccm	„	Bleiprobe	Gelblich	(-)	(-)
0,1 g „ „	250 ccm	„	„	Gelb- br unlich	Leichte Fluo- reszenz	(-)
0,1 g „ „	250 ccm	„	Salkow- ski.	Bräunlich	„	(-)
0,1 g „ „	200 ccm	„	NaOH- probe	„	„	Urobilin- spektrum
0,2 g „ „	220 ccm	„	Bleiprobe	Bräunlich -rötl.	„	Von 500 ab dunkel
0,2 g „ „	200 ccm	„	„	„	„	„
0,2 g „ „	200 ccm	„	„	„	„	„
0,2 g „ „	200 ccm	„	NaOH- probe	„	„	Urobilin- spektrum
0,2 g „ „	250 ccm	„	Bleiprobe	„	„	Von 500 ab dunkel
0,2 g „ „	250 ccm	„	„	„	„	„
0,2 g „ „	250 ccm	„	„	„	„	„
0,2 g „ „	200 ccm	„	„	„	„	„

Um die spektroskopischen Untersuchungen genauer auszuführen, habe ich den Harn des Versuchstiers gesammelt. 1500 ccm Harn wurden mit 50 ccm Eisessig angesäuert. Nach 48 stündigem Stehenlassen wurde der Harn abfiltriert und mit Wasser gut ausgewaschen. Der Niederschlag wurde noch feucht auf dem Filter mit 4% Natronlauge behandelt, wobei er sich nahezu löste. Der alkalischen Lösung wurde tropfenweise Eisessig zugesetzt, bis Ausflockung eintrat. Nach 48-stündigem Stehen wurde abfiltriert und mehrfach mit Wasser nachgewaschen. Die noch feuchten Niederschläge wurden nunmehr mit Methylalkohol, in dem sie schwer löslich sind, aufgeschwemmt und unter guter Eiskühlung durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas bis zur Sättigung versetzt. Hierbei löst sich beinahe der gesamte Niederschlag. Nach 24-stündigem Stehen unter häufigem Umschütteln wurde mit dem gleichen Volumen Methylalkohol verdünnt, und die Lösung abfiltriert. In die alkoholische Lösung, die nunmehr 100 ccm ausmachte, wurden 300 ccm Wasser gegossen, und dann feste pulverisierte Soda zugesetzt bis zur alkalischen Reaktion. Die Lösung wird in Freiheit gesetzt. Durch Umschütteln mit Chloroform (50 ccm) gelingt es leicht, den gesamten Farbstoff in das Chloroform überzuführen, das hierbei dünnbräunlich-rötliche Farbe annimmt. Die Chloroformlösung wird abfiltriert und bei gewöhnlicher Temperatur zur Trockne verdunstet. Der Rückstand wurde nicht krystallinisch.

Die Chloroformlösung zeigte im Spektrum folgendes:

Streifen I.	620-630	Nach Ansäuern mit Salzsäure
II.	560-580	Streifen I. 575
III.	520-535	II. 535-550
IV.	510-ab.	III. 475-ab.

Fischer fand für Urinporphyrin folgende Streifen:

Streifen I.	610-605
II.	580-570
III.	545-535
IV.	510-500.

Wenn man diese beiden spektroskopischen Befunde vergleicht, sieht man die schlagende Aenlichkeit der beiden Farbstoffspektren.

*B. An Menschen.*

Einen Teil der Versuche nahm ich an mir selbst vor. Die eingenommenen Chlorophyllmengen (ich nahm das Chlorophyll in Form des Chlorosan-Bürgi ein) und die Resultate sind aus der Tabelle II ersichtlich.

TABELLE II.

Chlorophyll- menge	Harn- menge	Harn- beschaffen- heit	Methode	Farbe	Fluo- reszenz	Spektrum
12 Tabletten (3 mal tägl. 4 Stück)	1100 cem	Hellgelb- sauer	Salkow- ski.	Gelblich	(-)	(-)
„	1000 cem	„	Bleiprobe	Gelb- bräunlich	(-)	(-)
„	1200 cem	„	„	„	Leichte Fluo- reszenz	(-)
„	1100 cem	„	„	„	„	Von 500 ab dunkel
„	1100 cem	„	„	„	„	„
„	1200 cem	„	„	Rot- bräunlich	„	„
18 Tabletten (3 mal tägl. 6 Stück)	1000 cem	„	NaOH- probe	Gelb- bräunlich	„	Urobilin- spektrum
„	1100 cem	„	Bleiprobe	Bräun- liehrötl.	„	Von 500 ab dunkel

Zur spektroskopischen Untersuchung habe ich von Chlorosan-Bürgi 18 Tabl. täglich eingenommen und den Harn gesammelt. In 8 Tagen bekam ich 8700 cem Harn, der auf oben beschriebene Weise verarbeitet wurde.

Die Chloroformlösung (50 cem) zeigte eine gelblichrötliche Farbe, nach Verdunsten bis auf 20 cem wurde die Farbe weinrötlich. Nachdem die Lösung bei gewöhnlicher Temperatur bis zur

Trockne verdunstet war, blieb ein klebriger Rückstand, der nicht kristallinisch geworden war.

Spektroskopische Untersuchung in Chloroformlösung :

Streifen I.	620-630
II.	560-580
III.	520-535
IV.	510-ab.

Spektroskopische Untersuchung nach Ansäuerung mit Salzsäure :

Streifen I.	575
II.	535-550
III.	475-ab.

Zur Kontrolle sammelte ich von 3 gesunden Kollegen 5000 ccm Harn und verarbeitete ihn nach derselben Methode. Die Farbe der Chloroformlösung in 50 ccm war schwach gelblich. Nach Verdunsten auf 10 ccm wurde sie gelblich-rötlich. Die spektroskopische Untersuchung ergab sehr schwach die drei Streifen, und zwar in der Lage

I.	560
II.	530
III.	500.

Bei der Harnuntersuchung trafen wir immer auf einen roten Farbstoff, welcher insbesondere bei der Verwendung der Bleiprobe störend einwirkte. Dieser Farbstoff konnte sowohl von Urobilin, wie auch von Hämatoporphyrin, wie auch von anderen Farbstoffen herrühren. Ich schlug deshalb ein anderes Verfahren ein, durch das ich den Harn durch fraktionierte Fällung von diesen unerwünschten Farbstoffen zu befreien suchte. 300 ccm Harn wurden mit gesättigter Baryumacetatlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Der Niederschlag (Fällung I) wurde abfiltriert, und das Filtrat abwechselnd mit Baryumacetat- und Natrium-

carbonatlösung versetzt. Das von dem mit Baryumacetat- und Sodalösung erhaltenen Niederschlag (Fällung II) getrennte Filtrat wurde neutralisiert und hernach mit Bleizuckerlösung vollständig gefällt (Fällung III). Alle fraktionierten Fällungen wurden mit salzsäurehaltigem Alkohol extrahiert. Ich gebe hier auszugsweise meine Resultate in Form einer Tabelle wieder (Siehe Tabelle III).

TABELLE III.

	Beschaffenheit des zur spektroskopischen Untersuchung verwendeten Filtrates von dem	
	Harn nach Chlorosaneinnahme.	normalen Harn.
Fraktion I	Gelblich mit etwas rötl. Ton. Fluoreszenz. Spektrum (—)	Gelblich. Spektrum (—)
Fraktion II	Weisslich klar. Spektrum (—)	Weisslich klar. Spektrum (—)
Fraktion III	Bräunlich rot. Leicht fluoreszierend. Spektrum von 500 ab dunkel. In entsprechender Verdünnung Urobilinstreifen sichtbar.	Gelblich. Leichte Fluoreszenz. Spektrum Andeutung. Urobilinstreifen sichtbar.

Wir sehen also, dass das von der Chlorophylleinnahme herührende Spektrum auch nach der Ausfällung der andern Farbstoffe sich gleich verhält; nämlich es ist von 500 ab dunkel. Ich bin mir völlig bewusst, dass auch andere Porphyrine in gleicher Weise spektroskopisch fassbar sind.

## II. KOTUNTERSUCHUNG.

Von den gleichen Kaninchen, die mit Chlorophyll gefüttert wurden, wurde auch der Kot gesammelt und nach der von Fischer angegebenen Methode untersucht:

100 g Kaninchenkot wurden in einer Reibschale gut verrieben; das Pulver wurde 24 Stunden lang mit Aether extrahiert. Es nahm eine blaubräunliche Farbe an und wurde dann einmal mit Alkohol ausgezogen. Der Rückstand wurde mit 500 ccm 1%iger Natriumbicarbonatlösung übergossen, und nachdem sofort nach beendeter Filtration wieder 500 ccm der Lösung zugegossen waren, schliesslich nochmals mit 500 ccm der Lösung extrahiert. Die Filtration dauerte etwa 3 Tage. Die Filtrate wurden mit Essigsäure gefällt und einen Tag stehen gelassen, dann filtriert. Den Niederschlägen wurde Methylalkohol zugesetzt, und trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung zugeleitet; nach 24 stündigem Stehen wurden sie mit dem gleichen Volumen Methylalkohol versetzt und abfiltriert, eine 3 fache Menge Wasser wurde zugegossen, dann wurde mit Soda alkalisiert, und nach Zusatz von 50 ccm Chloroform im Schütteltrichter geschüttelt. Das Chloroform hat dann eine etwas gelbliche Farbe angenommen. Es wurde bis ca. 10 ccm verdunstet und spektroskopisch untersucht; kein Porphyrinstreifen war sichtbar. Eine Untersuchung von normalem Kaninchenkot ergab denselben Befund.

Die Aetherauszüge wurden spektroskopisch untersucht. Es wurden dabei folgende Streifen gefunden:

- Streifen I. 655–645
- II. 566–545
- III. 495–465
- IV. 450–ab.

Als Kontrolle wurden 24 Stunden lang extrahierte Aetherauszüge von normalem Kaninchenkot untersucht. Die Aetherauszüge haben sich nur bräunlich gefärbt und ergaben spektroskopisch nur spärliche Urobilinstreifen. Sie wurden dann mit 25%iger Salzsäurelösung geschüttelt, wobei die blaue Farbe in eine grünliche überging. Diese Lösung wurde spektroskopisch untersucht und mit 25% salzsäurehaltiger, reiner Chlorophylllösung verglichen.

Versuchslösung:	Chlorophylllösung:
Streifen I. 650–640	660–640
II. 560–645	520–495
III. 470 ab.	475 ab.

Die spektroskopischen Untersuchungen mit Essigsäureauszügen oder Salzsäureauszügen ergaben dieselben Befunde wie die Aetherauszüge. Wir sehen, dass sich im Kot nach Chlorophyllinnahme kein Blutfarbstoff findet. Hingegen ist der im Urin auftretende Farbstoff dem Hämatoporphyrin nahe verwandt.

### III. SONNENLICHTSENSIBILISIERUNG MIT DEM NACH CHLOROPHYLL-EINNAHME SICH IM URIN AUSSCHIEDENDEN PORPHYRIN.

Nach H. Fischer (1915) vermag das Urinporphyrin weisse Mäuse gegen Licht zu sensibilisieren. Es handelt sich bei Fischer um Porphyrine, die aus dem Harn eines Porphyrinurikers stammen, also um Porphyrine, die aus dem Blut abstammen. Ellinger und Riesser (1916) vermochten solche Sensibilisierungsversuche auszuführen mit Porphyrinen nach Sulfonalvergiftung. Diese Forscher betrachten das nach Sulfonal- oder Trionalvergiftungen auftretende Porphyrin als mit dem von Fischer bei Porphyrinurie entdeckten Porphyrin identisch oder isomer.

Ich gebe hier die Resultate meiner Sensibilisierungsversuche wieder:

*Versuch 1.* Zwei weisse Mäuse von je 17 g Gewicht erhielten je 2 ccm einer verdünnten, schwach alkalischen Lösung des Farbstoffes, der als Methylester hergestellt wurde, subcutan injiziert.

Maus 1 kam sofort ins Dunkle und blieb hier ohne jede pathologische Erscheinung. Am nächsten Tage wurde sie im Zimmer am Tageslicht gehalten und blieb dauernd gesund.

Maus 2 wurde nach der Injektion sofort ins Sonnenlicht gebracht. Das Tier war bald äusserst still geworden und machte einen matten Eindruck. Es sah geschwollen aus. Nach einer Stunde wurde es vom Sonnenlicht entfernt und im Zimmer im

Tageslicht gehalten. Das Tier wurde allmählich immer schwächer. Am Abend des folgenden Tages war es verendet.

*Versuch 2.* Einer weissen Maus von 20 g Gewicht wurde 1 ccm einer verdünnten, schwach alkalischen Lösung des Farbstoffes, der als Aethylester hergestellt war, subcutan injiziert. Sie wurde nach der Injektion sofort an die Sonne gebracht. Bald machte sie einen sehr matten Eindruck analog dem vorhergehenden Versuch. Nach 1½ Stunden wurde sie aus dem Sonnenlicht entfernt und im Zimmer im gewöhnlichen Tageslicht gehalten. Das Tier wurde zusehends schwächer und ist nach 4 Stunden gestorben.

#### IV. ÜBER DIE UROBILINMENGE NACH CHLOROPHYLLEINNAHME.

Es fiel mir natürlich auf, dass bei allen Untersuchungen, die ich ausführte, Urobilin zugegen war. Ich habe deswegen an meine Untersuchungen eine Untersuchungsreihe, die das Verhalten des Urobilins bei Chlorophylleinnahme klären sollte, angeschlossen.

200 ccm Harn wurden mit Essigsäure angesäuert; dann wurde 1 Tropfen Jodtinktur zugesetzt und mit Ammoniumsulfat gesättigt; das Gemisch wurde mit 100 ccm etwas salzsäurehaltigen Chloroforms in einem Schütteltrichter gut geschüttelt. Das Urobilin geht dabei in das Chloroform über. Nach Stehenlassen wurden 50 ccm Chloroform abgenommen und nach Sallet (1897) spektrophotometrisch untersucht. Das Resultat ist aus der Tabelle IV ersichtlich.

TABELLE IV.

Chlorophyllmenge	Harnmenge	Verdünnung	Urobilinmenge
0	1350 ccm	1	107 mg
0	1200 "	1	96 "
0	1250 "	1	100 "
18 Tabletten (Chlorosan)	1150 "	5 : 10	184 "
"	1200 "	5 : 10	192 "
"	1250 "	5 : 7,5	150 "
"	1200 "	5 : 10	192 "
"	1050 "	5 : 7,5	127 "
15 Tabletten	1000 "	5 : 10	160 "

Bei Betrachtung der Tabelle sieht man, dass das Urobilin nach Chlorophylleinnahme ebenfalls vermehrt ist.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Auf Grund des spektroskopischen Befundes und des biologischen Verhaltens erscheint das nach Chlorophylleinnahme auftretende Urinporphyrin mit dem Blutporphyrin wahrscheinlich isomer.

2. Das Urobilin ist nach Chlorophylleinnahme immer vermehrt.

#### LITERATUR.

- Bürgi, E. (1916): Schweizer Korrespondenzblatt, 1916.  
Ellinger u. Riesser, (1916): Zeits. f. physiol. Chem., 98, 9.  
Fischer, H. (1915): Zeits. f. physiol. Chem., 95, 59.  
Garrod, A. (1895): Journal of Physiol., 17, 349.  
Godinho, A. (1925): Biochem. Zs., 155, 90.  
Hofstetter, M. (1925): Biochem. Zs., 155, 80.  
Hopkins, (1895): Jahresber. f. Tierchem., 25, 250.  
Kitahara, K. (1925): Biochem. Zs., 155, 97.  
Saillet, (1897): Revue de med., 17, 124.  
Salkowski, E. (1891): Zeits. f. physiol. Chem., 15, 294.  
Stokwis, (1899): Jahresber. f. Tierchem., 29, 841.



## INDEX TO VOLUME XII.

### A

Acidosis, The change in the amount of blood chlorine during asphyxiation from the view-point of ——. Report I. 161.

Adrenaline, On the adrenaline content in suprarenals and the amount of the ———-like substance in the serum of guinea pigs fed on a Vitamin C free diet. 419.

Albuminuria, A method of estimating the net volume of precipitated proteins in the ——. 7.

Aminohydrocarbostyryl, Über die antipyrethische Wirkung von 3-——, seinen Isomeren und Derivaten. 71.

Aminosäure, Über die Hydrolyse der Benzoylderivate der ———n durch das Histozytm. 107.

Amyostatische Gifte, Beiträge zur Kenntnis der chemischen Konstitution und der biologischen Wirkung: Über ——— (I Mitteilung), 429.

Anaerobic oxidation, Studies on the ——— of the auriculoventricular junction system. 241.

Antipyrethische Wirkung, Über die ——— von 3-Aminohydrocarbostyryl, seinen Isomeren und Derivaten. 71.

Askaris, Beiträge zur Chemie der ——. 27.

Asphyxia, On the behaviour of blood water during ——. 281.

Asphyxiation, The change in the amount of blood chlorine during

—— from the view-point of acidosis. Report I. 161.

Auriculoventricular junctional system, Biochemical studies on the ——— of heart. 223, 235, 241.

### B

Benzoylderivate, Über die Hydrolyse der ——— der Aminosäuren durch das Histozytm. 107.

Bilirubinbildungsfähigkeit, Über die ——— der überlebenden Milz von mit Thoriumdioxysol behandelten Hunden. 133.

Blood chlorine, The change in the amount of ——— during asphyxiation from the view-point of acidosis. Report I. 161.

Blood water, On the behaviour of ——— during asphyxia. 281.

### C

Calciumstoffwechsel, Über den Einfluss der Gallensäure auf den ——— (III). 59.

Chlorophyll, Beiträge zur Kenntnis der Nature des nach Einnahme von ——— im Urin auftretenden Porphyrin. 475.

Cholesterin content, The phosphatide and the ———. 235.

Cholsäure, Die Splachnikotomie und die Wirkung der ——— auf die Kreatininausscheidung. 371.

Cysteine, On the cystine and ——— contents of human hair. 187.

Cysteine, Potentiometric determination of cystine and ———. 207.

Cystine, On the — and cysteine contents of human hair. 187.

Cystine, Potentiometric determination of — and cysteine. 207.

## E

Electrode potentials, The — — of the silver halide electrodes against a mixture of different halide solutions. 411.

Epithelkörperchen-Hormon, Studien über das — — und den Kalkstoffwechsel. 35.

## F

Fieber, Experimentelle Untersuchungen über die Glykogenbildung in der Leber mit Hilfe von Durchblutungsversuchen bei künstlich hervorgerufenem —. 1.

FUJIKAWA, Hosabuō. Eine neue quantitative Mikrobestimmungsmethode der Gallensäuren in der Galle. 399.

FUJITA, Sei. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. IX. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Zuckerassimilation. (II). 383.

## G

Galle, Eine neue quantitative Mikrobestimmungsmethode der Gallensäuren in der —. 399.

Gallensäure, Die Bedeutung der — im Kohlehydratstoffwechsel. 139.

Gallensäure, Die Bedeutung der — im Kohlehydratstoffwechsel. 383.

Gallensäure, Eine neue quantitative Mikrobestimmungsmethode der — in der Galle. 399.

Gallensäure, Über den Einfluss der — auf den Calciumstoffwechsel. (III). 59.

Gallensäure, Über den Einfluss der — auf die Zuckerassimilation. (II). 383.

Gallensäure, Über den Mechanismus der hypoglykämischen Wirkung der —. 139.

Glykogenbildung, Experimentelle Untersuchungen über die — in der Leber mit Hilfe von Durchblutungsversuchen bei künstlich hervorgerufenem Fieber. 1.

Glyoxalse, Studies on —. 247.

Guinea pig, On the adrenaline content in suprarenals and the amount of the adrenaline-like substance in the serum of — —s fed on a Vitamin C free diet. 419.

## H

Hair, On the cystine and cysteine contents of human —. 187.

Halide, The electrode potentials of the silver halide electrodes against a mixture of different — solution. 411.

Heart, Biochemical studies on the auriculoventricular junctional system of —. 223, 235, 241.

Hemicellulose, Microchemical study of — in some plant cells, with special reference to its distribution in the protoplasm. 341.

Histozym, Über die Hydrolyse der Benzoylderivate der Aminosäuren durch das —. 107.

Hosizima, Tadao, Über Tauroisolithocholsäure aus Hühnergalle. 393.

Hühnergalle, Über Tauroisolithocholsäure aus —. 393.

Hunde, Über die Bilirubinbildungs-  
fähigkeit der über lebenden Milz  
von mit Thoriumdioxysol behan-  
delten —en. 133.

Hypoglykämischen Wirkung, Über den  
Mechanismus der — — der  
Gallensäure. 139.

## I

IMAZU, Tsunamoto. Experimentelle  
Untersuchungen über die Gly-  
kogenbildung in der Leber mit  
Hilfe von Durchblutungsversuchen  
bei künstlich hervorgerufenem  
Fieber. 1.

INABA, Michiaki. Studien über das  
Epithelkörperchen-Hormon und  
den Kalkstoffwechsel. 35.

INOUE, Kikuziro. A method of estima-  
ting the net volume of precipi-  
tated protein in the albuminuria.  
7.

IROI, Motoo, The effect of the presence  
of various salt on the surface  
tension of sodium taurocholate  
solution. 83.

IWANAGA, Yoshio. Weitere Unter-  
suchungen über den Einfluss der  
Splanchnikotomie auf die Zucker-  
ausscheidungsschwelle. 195.

## K

Kalkstoffwechsel, Studien über das  
Epithelkörperchen-Hormon und  
den —. 35.

Kapseleiweiss, Über die Spaltungs-  
produkte des —es von Hemi-  
fusis tuba Gmel. 471.

KIMURA, Hitoshi. On the degree of  
oxidation going on within the  
animal body under several condi-

tions. 351.

Kohlehydratstoffwechsel, Die bedeu-  
tung der Gallensäure im —.  
139, 383.

Kreatininausscheidung, Die Splan-  
chikotomie und die Wirkung der  
Cholsäure auf die —. 371.

## L

Leber, Experimentelle Untersuchungen  
über die Glykogenbildung in der  
— mit Hilfe von Durchblutung-  
versuchen bei künstlich hervor-  
gerufenem Fieber. 1.

## M

MALHOTRA, R. C. Microchemical study  
of hemicellulose in some plant  
cells, with special reference to its  
distribution in the protoplasm.  
341.

Metabolie activity, The — —.  
223.

Mikrobestimmungsmethode, Eine neue  
quantitative — der Gallen-  
säuren in der Galle. 399.

Microchemical study of hemicellulose  
in some plant cells, with special  
reference to its distribution in the  
protoplasm. 341.

Milz, Über die Bilirubinbildungs-  
fähigkeit der überlebenden —  
von mit Thoriumdioxysol behan-  
delten Hunden. 133.

## N

NAKAGAWA, Satoru u. FUJIKAWA, Ho-  
saburo. Eine neue quantitative  
Mikrobestimmungsmethode der  
Gallensäuren in der Galle. 399.

NAKAMURA, Hideo u. TSUNOO, Susumu.  
Über die Bilirubinbildungsfähig-

keit der überlebenden Milz von mit Thoriumdioxysol behandelten Hunden. 133.

NAKAMURA, Yasuo. Beiträge zur Kenntnis der Nature des nach Einnahme von Chlorophyll im Urin auftretenden Porphyrins. 475.

## O

ÔHATA, Shinsuke. Studies in experimental scurvy. X. On the adrenaline content in suprarenals and the amount of the adrenaline substance in the serum of guinea pigs fed on a Vitamin C free diet. 419.

Oxidation, On the degree of — going on within the animal body under several conditions. 351.

## P

Phosphatide, The — and cholesterol content. 235.

Plant cells, Microchemical study of hemicellulose in some — — with special reference to its distribution in the protoplasm. 341.

Porphyrin, Beiträge zur Kenntnis der Nature des nach Einnahme von Chlorophyll im Urin auftretenden —s. 475.

Potentiometric determination of cystine and cysteine. 207.

Protein, A method of estimating the net volume of precipitated —s in the albuminuria. 7.

Protoplasm, Microchemical study of hemicellulose in some plant cells, with special reference to its distribution in the —. 341.

## S

SAGARA, Jun-ichiro. Über die Spaltungsprodukte des Kapseleiweisses von *Hemifusus tuba* Gmel. 471.

SAGARA, Jun-ichiro. Zur Kenntnis der vergleichenden Biochemie. VII. Zur Chemie der besonderen Saké-Hefen. 459.

Saké-Hefen, Zur Chemie der besonderen — — —. 459.

Salt, On the nature of the effect of the addition of — upon the surface tension of sodium taurocholate solution. 317.

Salt, The effect of the presence of various —s on the surface tension of sodium taurocholate solution. 83.

SASAKI, Takaoki u. OTSUKA, Ichiro. Beiträge zur Kenntnis der chemischen Konstitution und der biologischen Wirkung: Über amyostatische Gifte (I. Mitteilung). 429.

SASO, Takeshi. On the behaviour of blood water during asphyxia. 281.

SASO, Takeshi. The change in the amount of blood chlorine during asphyxiation from the view-point of acidosis. Report I. 161.

Scurvy, Studies in experimental —. 419.

SEKITOO, Tadao. Über den Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel. (III). 59.

Serum, On the adrenaline content in suprarenals and the amount of the adrenaline like substance in the — of guinea pigs fed on a Vitamin C free diet. 419.

SHIONO, Masaie. On the nature of the effect of the addition of salt upon the surface tension of

- sodium taurocholate solution. 317.
- SIBUYA, Sigetosi. Über Tauroisolithocholsäure aus Hühnergalle. 393.
- Silver halide electrodes, The electrode potentials of the ——— against a mixture of different halide solutions. 411.
- Splanchnikotomie, Die ——— und die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung. 371.
- Splanchnikotomie, Weitere Untersuchungen über den Einfluss der ——— auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 195.
- So, Takehiko. Über die Hydrolyse der Benzoylderivate der Aminosäuren durch das Hitozym. 107.
- Surface tension, On the nature of the effect of the addition of salt upon the ——— of sodium taurocholate solution. 317.
- Surface tension, The effect of the presence of various salts on the ——— of sodium taurocholate solution. 83.
- salt upon the surface tension of sodium ———. 317.
- Taurocholate solution, The effect of the presence of various salts on the surface tension of sodium ———. 83.
- Tauroisolithocholsäure, Über ——— aus Hühnergalle. 393.
- Thoriumdioxydsol, Über die Bilirubinbildungsfähigkeit der überlebenden Milz von mit Thoriumdioxydsol behandelten Hunden. 133.
- TSUJI, Kaneji. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. (VIII). Über den Mechanismus der hypoglykämischen Wirkung der Gallensäure. 139.
- TSUNOO, Susumu und NAKAMURA, Hideo. Über die Bilirubinbildungsfähigkeit der überlebenden Milz von mit Thoriumdioxydsol behandelten Hunden. 133.
- ## U
- UGAMI, Hanako and TADOKORO, Tetsutaro. On the cystine and cysteine contents of human hair. 187.
- URAKI, Ziro. Über Tauroisolithocholsäure aus Hühnergalle. 393.
- Urin, Beiträge zur Kenntnis der Nature des nach Einnahme von Chlorophyll im ——— auftretenden Porphyrins. 475.
- ## V
- Vergleichende Biochemie, Zur Kenntnis der ———. 459.
- Vitamin C, On the adrenaline content in suprarenals and amount of the adrenaline like substance in the serum of guinea pigs fed on a ——— free diet. 419.

## T

- TADOKORO, Tetsutaro and UGAMI, Hanako. On the cystine and cysteine contents of human hair. 187.
- TAKATA, Hiroshi. Über Tauroisolithocholsäure aus Hühnergalle. 393.
- TAKU, Aijiro. Die Splanchnikotomie und die Wirkung der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung. 371.
- TANIDA, Juzaburo. The electrode potentials of the silver halide electrodes against a mixture of different halide solution. 411.
- Taurocholate solution, On the nature of the effect of the addition of

## W

WATANABE, Kazuo. Über die antipyretische Wirkung von 3-Aminohydrocarbostyrl, seinen Isomeren und Derivaten. 71.

## Y

YAMAZAKI, Kageyu. Potentiometric determination of cystine and cysteine. 207.

—— — Biochemical studies on the auriculoventricular junctional system of heart. II. The metabolic activity. III. The phosphatide

and the cholesterin content. IV. Studies on the anaerotic oxidation of the auriculoventricular junctional system. 223, 235, 241.

YOSHIMURA, Shigeo. Beiträge zur Chemie der Askaris. 27.

Zuckerassimilation, Über den Einfluss der Gallensäure auf die —. (II). 383.

## Z

Zuckerausscheidungsschwelle, Weitere Untersuchungen über den Einfluss der Splanchnikotomie auf die —. 195.

---